

Implementação de um Sistema Experimental em Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA)

Sara Raquel Ferreira Alves Martins

Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos

Departamento de Biologia

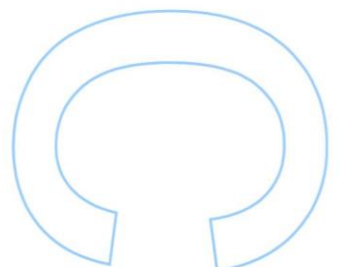
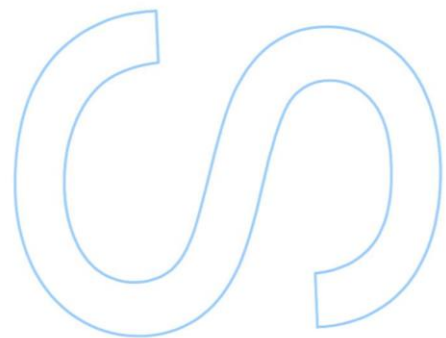
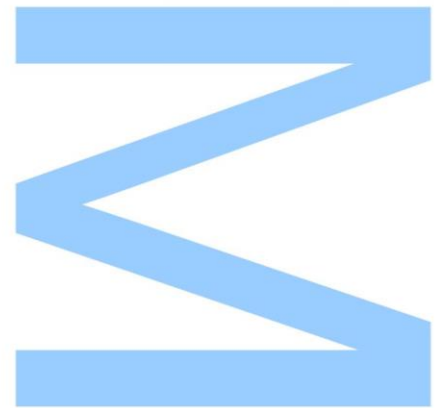
2016/2017

Orientação

Dr^a Maria Helena Tabuaço Rego Martins Peres, Investigadora Auxiliar, CIIMAR

Coorientação

Rui Pedro Moreira de Magalhães, Bolseiro de Investigação, FCUP

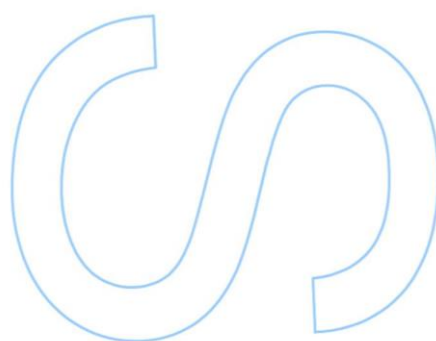
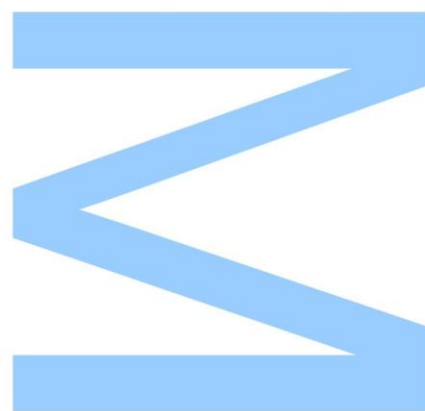




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Este trabalho foi parcialmente suportado pelo projeto **INNOVMAR** – *Innovation and Sustainability in the Management and Exploitation of the Marine Resources* (Ref. NORTE-01-0145-FEDER-000035), e foi realizado no âmbito da sua linha de investigação **INSEAFOOD** – *Innovation and Valorization of the Seafood Products: Meeting Local Challenges and Opportunities*; projeto financiado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020), através do Fundo Europeu do Desenvolvimento Regional (FEDER).



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

A realização do mesmo foi apenas possível graças à integração no grupo de investigação **NUTRIMU** – *Fish Nutrition and Immunology Group*, grupo pertencente ao **CIIMAR** – Centro de Investigação Marinha e Ambiental.



Publicações Associadas à Presente Dissertação de Mestrado

Conferências

- Parte deste trabalho foi apresentado, com o título “***Implementation of an Experimental Integrated Multitrophic Aquaculture System – IMTA***”, na 2ª edição do Workshop AQUAIMPROVE, que teve lugar no Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões – CIIMAR, no Porto (Portugal), a 17 de Março de 2017.



- Foi também realizada uma comunicação oral, sob o mesmo título anteriormente referido, no *Neptune Seminar Series*, organizados pelo CIIMAR, que decorreu nas suas atuais instalações, a dia 19 de Maio de 2017.



- O presente trabalho vai ainda ser exibido sob a forma de apresentação oral, intitulado “***Implementation of a Laboratorial Integrated Multitrophic Aquaculture System (IMTA) for European Seabass, Sea Urchin and Seaweed Production***”, no 17º *International Symposium of Aquaculture Europe, AE2017*, que irá ter lugar no Hotel & Resort VALAMAR, em Drubrovnik (Croácia), entre os dias 17 e 20 de Outubro de 2017.



Agradecimentos

Durante a realização da presente Dissertação de Mestrado, e ao longo de todo este ano pude contar com o apoio e a cooperação de vasto grupo de pessoas, às quais estou profundamente agradecida. Entre família, amigos, colegas de trabalho e orientadores, e correndo o risco de injustamente não mencionar alguém, gostaria de deixar expresso o meu apreço e agradecimento.

Ao Prof. Dr. Aires Oliva-Teles, Diretor do Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos, por me ter aceite como sua aluna no mesmo, e por me proporcionar a oportunidade de integrar o seu grupo de investigação – NUTRIMU – para desenvolver este trabalho. Foi uma honra trabalhar com cada um dos membros do NUTRIMU. Obrigada por me acolherem tão bem, pela dedicação, experiência e saberes essenciais transmitidos.

À Dr.^a Helena Peres, minha querida Orientadora, pela sua total disponibilidade, apoio e orientação. Pelo seu empenho, dedicação e partilha de conhecimentos, pelas suas valiosas opiniões, críticas e contributos indispensáveis para o trabalho. Por todas as suas amáveis palavras, pela amizade e confiança depositada em mim, que me proporcionaram crescer, não só a nível profissional, mas também pessoal, tornando possível a concretização desta tese

Ao Rui Magalhães, meu Coorientador, que diária e incansavelmente me acompanhou. Por todo o seu trabalho e empenho, pela sua insubstituível orientação e apoio prestados, e por toda a sabedoria transmitida. Sem a sua colaboração e participação neste grande projeto, não teríamos chegado tão longe. Obrigada Rui.

Ao Sr. Pedro Correia, “guardião” das instalações da Foz, por todo o precioso auxílio e ajuda prestados, pela sua ímpar assistência técnica, essencial ao bom funcionamento de todo o complexo na estação de Zoologia Marinha da UP. Pela aprendizagem e passagem de conhecimentos aqui aos mais novos, por toda a paciência, dedicação e preocupação. Simplesmente pela sua presença em cada nova etapa prática do projeto e a cada momento difícil, muito obrigada Sr. Pedro.

Aos estagiários, Ricardo Andrade e Ana Inês Amaral, pela vontade de aprender e de trabalhar, pela devoção ao projeto em si, e pela fundamental ajuda e cooperação durante os ensaios.

A todos os meus colegas de trabalho na Foz, e em particular aos meus “coleguinhas” de Mestrado, Ricardo Pires e Nicole Pires, com quem tive o prazer de partilhar o mesmo espaço. Pela ajuda e colaboração quando necessária, pelas ocasiões de boa disposição e alegria, e pela partilha bons e menos bons momentos no trabalho.

Aos meus Amigos e Amigas, pela vossa amizade e por serem quem são. Em especial:

À Nicole Pires, minha querida e indispensável amiga, por todo o seu companheirismo, boa disposição e assistência no trabalho. Por toda a sua motivação, compreensão e afeição, e por todos momentos que passamos juntas.

À Joana Serrão, por se ter tornando fundamental na minha vida. “Miga”, obrigada por toda a paciência e carinho, por todos os sábios conselhos e opiniões, e por todo o apoio que me deste durante estes dois longos anos. Foi este mestrado que nos juntou, mas tenho a certeza que te levarei para a vida!

À Babara Cavaleiro, à Inês Canastra e restantes Colegas de Mestrado, por me aturarem e acompanharem durante o mesmo.

À Sofia Galiza, minha velha amiga de infância, que o curso de Biologia, há uns valentes anos, fez o favor de reaproximar. Minha “tremguinha”, obrigada por te manteres fiel à nossa amizade, independentemente da distância ou do tempo que nos separe.

À Maria Santos, ao Pedro Fernandes, à Maria João Xavier e à Mariana Sá, pela presença, pela força e pelo carinho.

À minha Família, em particular e especialmente:

À minha querida Mãe, Isabel Ferreira, por todo o fundamental apoio e auxílio sem hora nem local. Por independentemente de tudo e qualquer coisa, estar comigo e por nunca desistir de mim. Pela a educação que me deu, pelos valores que me passou, pela formação que me permitiu ter, e pela entrega e devoção que sempre me mostrou e ensinou. Por todos os seus contributos que fazem de mim aquilo que eu hoje sou, e

por tudo que sempre fez, faz e continuará a fazer por mim. Pelo exemplo de pessoa que é, por todo o seu amor e carinho total e absoluto, muito obrigada Mamã!

Aos meus adorados Avós, Maria de Lourdes e Fernando Ferreira, por todo o vosso o suporte, acompanhamento e dedicação, e por estarem sempre presentes mesmo quando a distância nos separa. Pelo entusiasmo e atenção a cada conversa, por toda a paciência e permanente disposição para me atuarem, e pelos preciosos conselhos e contributos dados durante toda a minha vida. Por me verem crescer, tanto por fora como por dentro, e por sempre me guiarem e auxiliarem a percorrer este meu caminho. Por todo o calor, carinho e afeto infindáveis que me dão a cada dia que estamos juntos, e pelo vosso genuíno amor, muito obrigada “Mãezinha” e “Paizinho”!

Aos três, a quem eu tudo devo, ADORO-VOS!

Por fim, mas de todo não menos relevante, ao meu Namorado, José Martins, que se manteve a meu lado a cada momento, apoiando-me total e incondicionalmente. Por toda a sua dedicação e motivação, por toda a paciência de me ouvir e aturar a qualquer hora do dia ou da noite, e por toda a força e esperança que sempre me deu. Por todas aquelas palavras de incentivo e coragem cruciais nos momentos certos e de maior necessidade, por ter constantemente acreditado nas minhas capacidades, e por nunca ter duvidado de que seria capaz. Por mais do que ter acreditado em mim, foi ter-me feito acreditar em mim mesma, por me amparar durante toda esta etapa, sem nunca desistir. Por fazer de mim uma pessoa melhor, pela importância absoluta que tem no meu mundo, e por poder sempre contar com o seu ombro. Por ser mais do que um pilar na minha vida, por ser o meu porto seguro. Pela sua eterna amizade, por todo o conforto dado, e por todo o seu carinho e amor transmitidos. A minha gratidão para contigo será eterna. Obrigada, simplesmente por tudo! “\..|/”

Cada um de vocês contribuiu, à sua maneira, para que eu chegasse mais longe, para que o meu trabalho se tornasse melhor, e para que todo este projeto se tenha concretizado. Sem a vossa imprescindível ajuda, não teria sido possível. O meu mais sincero e profundo agradecimento.

MUITO OBRIGADA!

Resumo

A rápida expansão da produção aquícola mundial, especialmente, impulsionada pelos sistemas de cultivo intensivos, está diretamente associada a possíveis impactos ambientais, que podem por em causa a sustentabilidade do sector da aquacultura. A sua crescente expansão requer a urgente procura e utilização de práticas mais sustentáveis, que viabilizem a produção do ponto de vista económico e ambiental. Assim, surge a aquacultura multitrófica integrada.

A aquacultura multitrófica integrada (IMTA) consiste na integração não só de diferentes espécies, mas espécies de níveis tróficos distintos, num mesmo sistema. Portanto, o IMTA promove e proporciona um reaproveitamento e conversão da maioria dos desperdícios recorrentes nas monoculturas, através da combinação entre a cultura de peixes e organismos extrativos. Esta coprodução alcançada através de práticas sustentáveis, é excelente para a produção em geral, trazendo múltiplos benefícios, que vão desde a sustentabilidade ecológica – obtida através da biomitigação, biorremediação e redução do impacto ambiental; à estabilidade económica – atingida através da diversificação de produtos cultivados, do aumento da eficiência de produção, acompanhado pelo retorno de capital e redução dos custos operacionais.

O principal objetivo da presente Dissertação de Mestrado foi avaliar a viabilidade, o potencial e a eficiência de um sistema IMTA, integrando Robalo (*Dicentrarchus labrax*), Ouriço-do-Mar (*Paracentrotus lividus*) e Alface-do-Mar (*Ulva lactuca*). Para isso, foram realizados dois ensaios em IMTA de modo a otimizar a melhor e mais eficiente configuração para este sistema; sendo que no primeiro foi aferida qual a densidade ótima de *stock* para os robalos, e no segundo qual a melhor taxa de alimentação para os ouriços. Foram ainda realizados, um terceiro ensaio, que aferiu as diferenças na taxa de crescimento das algas consoante a água em que estas estariam a ser produzida, e dois ensaios de digestibilidade, para determinar a eficiência de assimilação do alimento, tanto nos peixes, como nos ouriços.

Foram construídos, à escala experimental seis sistemas IMTA, iguais e independentes, na estação de Zoologia Marinha da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Cada sistema é composto por 4 tanques (80L), alimentados por um fluxo contínuo e fechado de água salgada, em que a água de saída do tanque superior, constitui a água de entrada do tanque seguinte (direção do fluxo: peixes, ouriços, algas, retornando aos peixes). O tanque dos peixes foi desenhado para incluir uma espécie de “armadilha” de matéria particulada, com o objetivo de assegurar a

passagem contínua das fezes e restos de alimento para o tanque dos ouriços, e só posteriormente para o tanque das algas.

O Ensaio I teve a duração de 70 dias, foi conduzido à temperatura de 18°C com um fotoperíodo 12:12h, e seu principal objetivo foi testar qual a melhor densidade de *stock* para o robalo. No início do ensaio foram estabelecidas três densidades iniciais diferentes, que foram testadas em duplicado: 3,5 kg/m³; 7 kg/m³ e 14 kg/m³. Em cada um dos sistemas a densidade de *stock* inicial para ouriços (20 kg/m³) e algas (2 kg/m³) foi igual. Os robalos foram diariamente alimentados com uma dieta comercial (46% Proteína; 18% Lípidos), e os ouriços foram alimentados, duas vezes por semana, com algas produzidas no próprio sistema IMTA. No início e no final do ensaio foi determinado o peso de cada lote de robalos e ouriços, e o diâmetro de cada ouriço. As algas foram pesadas no início e a cada 7 dias, e a sua biomassa foi sendo reajustada à densidade inicial.

O Ensaio II teve a duração de 46 dias, decorrendo nas mesmas instalações e condições abióticas do ensaio anterior, mas o seu principal objetivo foi testar qual a melhor taxa de alimentação para os ouriços. A densidade de *stock* inicial para os peixes foi de 7 kg/m³ (densidade ótima determinada no ensaio I) e para os ouriços de 10 kg/m³. No caso das algas, as condições foram diferentes, sendo que em cada sistema foram colocados 20 discos de *Ulva*, juntamente com 5 frondes de *Chondrus crispus*. Os robalos foram alimentados nas mesmas circunstâncias já descritas para o ensaio I. Em duplicado, os ouriços foram semanalmente alimentados com uma dieta preparada, feita de *Ulva* seca e *agar-agar* (13% Proteína; 9% Lípidos; 29% NFE), a três taxas diferentes: 0g; 30g e 45g. No início e no final do ensaio foi determinado o peso de cada lote de robalos e ouriços, e o diâmetro de cada ouriço. As algas foram pesadas no início e a cada 7 dias, durante todo o ensaio.

O Ensaio III consistiu em testar a taxa de crescimento relativa (TCR) da *Ulva* variando a proveniência da água de cultivo: água do mar, ou água proveniente de cada uma das 3 densidades de *stock* testadas no Ensaio I.

Foram ainda realizados dois ensaios de digestibilidade, um com os robalos e outro com os ouriços, em que na sua alimentação foi incorporado um marcador inerte de modo a podermos quantificar a eficiência de assimilação do alimento pelos respectivos organismos.

No final do primeiro ensaio, o crescimento, a ingestão e a eficiência de conversão alimentar (ECA) dos peixes não foram afetadas pelas diferentes densidades. Os ouriços mantidos na densidade média apresentaram um ganho de diâmetro e taxa de

crescimento diária (TCD) significativamente mais elevados, enquanto que a TCR das algas não foi significativamente afetada pelas diferentes densidades.

No final do segundo ensaio, o crescimento, a ingestão e a ECA dos peixes não foram afetadas pelas diferentes taxas de alimentação dos ouriços. Os ouriços alimentados com 45 g/semana apresentaram um ganho de diâmetro, peso e TCD significativamente mais elevados. A TCR da *U. lactuca* não foi significativamente afetada pelas diferentes taxas de alimentação dos ouriços, enquanto que a TCR do *C. crispus* foi negativamente afetada.

No final do terceiro ensaio, a TCR da *U. lactuca* foi significativamente maior quando esta cresceu em águas provenientes das densidades mais baixas.

O melhor cenário de produção destas espécies em IMTA seria: robalos alimentados até à saciedade e a uma densidade de 7 Kg/m³, integrados com ouriços alimentado com 45 g/semana de dieta prepara e a uma densidade de 10-20 Kg/m³, integrados com *Ulva*. Em conclusão, os efluentes de *D. labrax* provam ser adequados para a produção integrada com *P. lividus* e *U. lactuca*, sugerindo que a produção e diversificação económica das aquaculturas é viável.

Palavras Chave: Aquacultura Multitrófica Integrada; IMTA; Biomitigação, Redução do Impacto Ambiental; Produção Integrada; *Dicentrarchus labrax*; *Paracentrotus lividus*; *Ulva lactuca*.

Abstract

The rapid expansion of world's aquaculture production, especially driven by intensive large-scale farming systems, is directly associated with several environmental impacts, which may jeopardize the sustainability of the aquaculture industry. Its increasing expansion requires an urgent need for more sustainable practices, which empower production from an economic and environmental point of view. Thus, integrated multitrophic aquaculture emerges.

Integrated multitrophic aquaculture (IMTA) involves not only the integration of distinct species, but species from different trophic levels into the same system. Therefore, IMTA promotes and provides reuse, recycle and conversion for the recurrent wastes in monocultures, through the combination of fish production with commercial relevant extractive species. When cultivated alongside with fed fish species, these organisms should be able to assimilate, whether organic or inorganic wastes, mostly originated by uneaten feed pellets, fish feces, and other excretory products. This coproduction, achieved through more sustainable practices, is exceptional for the production in general, bringing multiple benefits ranging from ecological sustainability (biomitigation, bioremediation and reduction of environment impact) to economic stability (diversification of cultivated products, reduced operating costs, increased production efficiency and capital return).

The main aim to this Master's Dissertation was to assess feasibility, potential and efficiency of an IMTA system, integrating European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), with European sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and sea lettuce (*Ulva lactuca*). To accomplish this, two main trials were performed in order to optimize the best and most efficient configuration for this IMTA system, testing the optimum fish stocking density and the optimum feeding rate for sea urchins, respectively. A third experiment was carried out to evaluate differences in algae relative growth rate (RGR) according to the water used to produce it. Also, there were conducted two digestibility trials to determine fish and sea urchin food assimilation and its apparent digestibility.

Six equal and independent experimental scale IMTA systems were implemented at the Marine Zoological Station, Porto University. Each system was composed by 4 tanks (80L), functioning in a closed recirculating system, and each one was supplied by a continuous water flow from the previous tank (flow direction: fish, sea urchin, seaweed, returning to fish unit). The fish tank was designed to include a particulate organic matter trap which ensure that all feces and uneaten food continuously moved to the sea urchin tank, and then to the seaweed tank.

Trial I was conducted for 70 days at 18°C with a 12/12 hours light cycle, and its key propose was to assess the optimum European sea bass stocking density. At the beginning, in duplicates, three fish stocking densities were established: 3.5 kg/m³, 7 kg/m³ and 14 kg/m³. In all the systems, the initial stocking density for sea urchin (20 kg/m³) and seaweed (2 kg/m³) was equal. Fish were daily fed with a commercial diet (46% crude protein; 18% crude fat) and sea urchins were fed, twice a week, with seaweeds produced in the IMTA system. At the beginning and at the end of the trial, fish and sea urchins were group weighted, and sea urchin individual diameter was measured. Seaweeds were weighted at the beginning and every seven days, so that we could readjust its total biomass to maintain the initial stocking density.

Trial II was conducted for 46 days in the same experimental systems, at the same abiotic conditions, however its key propose was to assess the optimum feeding rate of European sea urchin. Initial stocking density was established at 7 kg/m³ for fish (the optimum fish density assessed with trial I) and 10 kg/m³ for sea urchin. In this second trial, the situation for the algae was a bit different. At each system, in the seaweeds tank were placed 20 *Ulva* circles each with 2 cm of diameter, and 5 *Chondrus crispus* fronds. Fish were fed in the same conditions as in trial I. In duplicates, sea urchin tanks were weekly fed a prepared diet, made of dried *Ulva* and *agar-agar* (13% crude protein; 9% crude fat and 29% NFE), at three ration levels: 0g; 30g and 45 g. At the beginning and at the end of the trial, fish and sea urchins were group weighted, and sea urchin individual diameter was measured. Algae were weighted at the beginning and every seven days during the trial.

Trial III tested *Ulva lactuca* RGR, while varying the source of water used to cultivate it: sea water or water from each one of the fish stocking densities tested in Trial I.

Two digestibility trials were carried out, one with sea bass, and the other one with sea urchins. An inert marker was incorporated into the used diets in order to quantify apparent digestibility and food assimilation by the respective organism.

At the end of Trial I, fish growth, feed intake (FI) and feed efficiency (FE) were not affected by fish stocking density. Sea urchin maintained at medium fish stocking density had higher total diameter gain and daily growth rate (DGR), while RGR of *U. lactuca* was not significantly affected by fish density.

At the end of Trial II, fish growth, FI and FE were not affected by feeding rate of sea urchin. Sea urchin fed at the higher feeding rate (45 g/week) had the highest final weight and DRG. RGR of *U. lactuca* was not significantly affected by sea urchin feeding rate, while RGR of *C. crispus* was negatively affected.

At the end of Trial III, *U. lactuca* RGR was significantly higher when it grew in waters from the lowest fish stocking densities.

The best scenario to produce simultaneously this species under an IMTA system should be: fish stocking density at 7 Kg/m³, fed *at libitum*; associated with sea urchin at 10-20 Kg/m³, fed at 45 g/week; associated with *Ulva*. In conclusion, *D. labrax* effluents proved suitable for *P. lividus* and *U. lactuca* cultivation, suggesting that production and economic diversification of industrial fish facilities may be feasible.

Keywords: Integrated Multitrophic Aquaculture; IMTA; Bio mitigation; Reduction of Environmental Impacts; Integrated Production; *Dicentrarchus labrax*; *Paracentrotus lividus*; *Ulva lactuca*.

Índice

| | |
|--|----|
| Índice de Figuras | 3 |
| Índice de Tabelas | 5 |
| Glossário | 6 |
| 1. Introdução..... | 8 |
| 1.1 Aquacultura | 8 |
| 1.2 Aquacultura Multitrófica Integrada | 13 |
| 1.3 Seleção das Espécies | 20 |
| 1.3.1 Robalo Europeu (<i>Dicentrarchus labrax</i> , Linnaeus, 1758) | 20 |
| 1.3.2 Ouriço-do-Mar (<i>Paracentrotus lividus</i> , Lamark, 1816) | 22 |
| 1.3.3 Alface-do-Mar (<i>Ulva lactuca</i> , Linnaeus, 1753)..... | 24 |
| 1.3.4 Musgo-do-Mar (<i>Chondrus crispus</i> , Stackhouse, 1797) | 26 |
| 1.4 Objetivos | 28 |
| 2. Material e Métodos | 29 |
| 2.1 Sistemas IMTA..... | 29 |
| 2.2 Ensaaios Experimentais | 30 |
| 2.2.1 Ensaaios de Crescimento | 30 |
| a) Ensaio I..... | 31 |
| b) Ensaio II..... | 33 |
| c) Ensaio III | 36 |
| 2.2.2 Ensaaios de Digestibilidade | 37 |
| a) Ensaio I..... | 37 |
| b) Ensaio II..... | 39 |
| 2.3 Análises Químicas..... | 40 |
| 2.3.1 Humidade | 40 |
| 2.3.2 Cinzas..... | 40 |
| 2.3.3 Proteína Bruta..... | 40 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2.3.4 Lípidos Totais | 41 |
| a) Método de <i>Soxtec</i> | 41 |
| b) Método de <i>Folch</i> | 42 |
| 2.3.5 Óxido de Crómio | 42 |
| 2.3.6 Metabolitos Plasmáticos | 44 |
| 2.3.7 Imunologia dos Ouriços | 45 |
| 2.4 Procedimentos Analíticos | 47 |
| 2.5 Análise Estatística | 49 |
| 3. Resultados..... | 50 |
| 3.1 Ensaios de Crescimento..... | 50 |
| 3.1.1 Ensaio I | 50 |
| 3.1.2 Ensaio II | 55 |
| 3.1.3 Ensaio III | 57 |
| 3.2 Ensaios de Digestibilidade | 58 |
| 4. Discussão | 59 |
| 4.1 Os Robalos | 60 |
| 4.2 Os Ouriços | 63 |
| 4.3 As Algas | 67 |
| 5. Considerações Finais | 72 |
| Referências Bibliográficas | 74 |
| Anexos | 85 |

Índice de Figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 – “ <i>Aquaculture is Expanding to Meet World Fish Demand</i> ” (Adaptado: FAO, 2016) | 8 |
| Figura 2 – Peso relativo da contribuição da Aquacultura e das Pescas no consumo de pescado na alimentação mundial (FAO, 2014) | 9 |
| Figura 3 – Esquema representativo de um possível ciclo de nutrientes num sistema IMTA..... | 14 |
| Figura 4 – Esboço ilustrativo do funcionamento em offshore de um sistema IMTA (OC, 2009) | 14 |
| Figura 5 – Exemplares das espécies a integrar no sistema multitrófico integrado (1. Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>); 2. Ouriço-do-Mar (<i>Paracentrotus lividus</i>); 3. Alface-do-Mar (<i>Ulva lactuca</i>); 4. Musgo-do-Mar (<i>Chondrus crispus</i>))..... | 20 |
| Figura 6 – Robalo Europeu (<i>Dicentrarchus labrax</i>) (WWF, 2017)..... | 21 |
| Figura 7 – Ouriço-do-Mar (<i>Paracentrotus lividus</i>) (Fotografia tirada por Sara Martins) | 22 |
| Figura 8 – Alface-do-Mar (<i>Ulva lactuca</i>) (Algaebase, 2017) | 24 |
| Figura 9 – Musgo-do-mar (<i>Chondrus crispus</i>) (MACOI, 2017) | 27 |
| Figura 10 – Sistema IMTA: Fluxo de Água Peixes → Ouriços → Algas (Fotografia tirada por Sara Martins) | 29 |
| Figura 11 – Sistemas IMTA totalmente operacionais (Fotografia tirada por Sara Martins) | 30 |
| Figura 12 – Amostragem dos Robalos (Fotografia tirada por Ricardo Andrade)..... | 32 |
| Figura 13 – Amostragem dos Ouriços (Fotografia tirada por Sara Martins)..... | 33 |
| Figura 14 – Discos de <i>Ulva lactuca</i> (Fotografia tirada por Sara Martins) | 34 |
| Figura 15 – Dieta preparada em laboratório para a alimentação dos Ouriços-do-Mar (<i>P. lividus</i>) (Fotografia tirada por Rui Magalhães)..... | 34 |
| Figura 16 – Recolha das algas para posterior medição e pesagem (Fotografias tiradas por Sara Martins) | 35 |
| Figura 17 – Medição dos discos de <i>Ulva lactuca</i> (Fotografia tirada por Sara Martins) | 36 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 18 – Sistema onde decorreu o ensaio de Digestibilidade dos Robalos (Fotografia tirada por Sara Martins) | 38 |
| Figura 19 – Processo de Oxidação-Redução do Óxido de Crómio. (Fotografia tirada por Sara Martins) | 43 |
| Figura 20 – Balões volumétricos com as amostras prontas a ser lidas no espectrofotómetro (Fotografia tirada por Sara Martins)..... | 44 |
| Figura 21 – Determinação de Metabolitos Plasmáticos em Microplacas. (Fotografia tirada por Sara Martins) | 45 |
| Figura 22 – Gráfico que traduz o Nível de Metabolitos Plasmáticos (mg/dl) nos Robalos (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Integrados no Ensaio I | 53 |
| Figura 23 – Gráfico que traduz a Atividade Bactericida I contra <i>Vibrio anguillarum</i> e <i>Photobacterium damsela</i> subsp. piscicida (Phdp), estirpe PP3 dos Ouriços-do-Mar (<i>Paracentrotus lividus</i>) integrados no Ensaio I | 54 |
| Figura 24 – Gráficos que traduzem A: Atividade Haemolítica do Fluido Celómico B: Concentração de Lisozima (µg/ml), dos Ouriços-do-Mar (<i>Paracentrotus lividus</i>) que integraram o Ensaio I | 54 |
| Figura 25 – Gráfico de Comparação das Taxas de Crescimento Relativas (%/dia) das Algas Integradas (<i>Ulva lactuca</i> & <i>Chondrus crispus</i>) no Ensaio II | 56 |
| Figura 26 – Gráfico das Taxas de Crescimento Relativas (%/dia) da <i>Ulva lactuca</i> nos diferentes Tipos de Águas testadas no Ensaio III | 57 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 – Composição Química Proximal (% Matéria Seca) da Dieta Comercial usada na alimentação dos Robalos (<i>Dicentrarchus labrax</i>); das Algas Frescas (<i>Ulva</i>) e Dieta Preparada utilizadas para alimentar os Ouriços (<i>Paracentrotus lividus</i>) no decorrer do Ensaios I e II, respetivamente..... | 50 |
| Tabela 2 – Performance do Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>), Ouriço-do-Mar (<i>Paracentrotus lividus</i>) e Alface-do-Mar (<i>Ulva lactuca</i>) no final do Ensaio I | 51 |
| Tabela 3 – Composição Corporal Proximal (% Matéria Fresca) dos Robalos (<i>Dicentrarchus labrax</i>), Gónadas dos Ouriços-do-Mar (<i>Paracentrotus lividus</i>), e das Algas (<i>Ulva lactuca</i>), no Início e Final do Ensaio I | 52 |
| Tabela 4 – Metabolitos Plasmáticos dos Robalos (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no Final do Ensaio I | 52 |
| Tabela 5 – Performance do Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>), Ouriço-do-Mar (<i>Paracentrotus lividus</i>), Alface-do-Mar (<i>Ulva lactuca</i>) e Musgo-do-Mar (<i>Chondrus crispus</i>), no final do Ensaio II | 55 |
| Tabela 6 – Composição Química Proximal (% Matéria Seca) das Dietas e das Fezes, com respetivo Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA) (%) dos Ensaios de Digestibilidade dos Robalos (<i>Dicentrarchus labrax</i>) (I) e dos Ouriços (<i>Paracentrotus lividus</i>) (II)..... | 58 |

Glossário

AD – Alta Densidade

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

BD – Baixa Densidade

CDA – Coeficiente de Digestibilidade Aparente

CEP – Coeficiente de Eficácia Proteica

CFU – Colony Forming Units

CIIMAR – Centro de Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

DGRM – Direção Geral dos Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marinhos

EC – European Commission

ECA – Eficiência de Conversão Alimentar

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FCUP – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

FI – Feed Intake

GG – Gonadal Growth

HRAP – High Rate Algal Ponds

IDREEM – Increasing Industrial Resource Efficiency in European Mariculture

IMTA – Integrated Multitrophic Aquaculture

INNOVMAR – Innovation and Sustainability in the Management and Exploitation of Marine Resources

INSEAFOOD – Innovation and Valorization of Seafood Products: Meeting Local Challenges and Opportunities

MACOI – Portuguese Seaweed Website (Macroalgae)

MD – Média Densidade

MF – Matéria Fresca

MS – Matéria Seca

NUTRIMU – Fish Nutrition and Immunology Group

OC – Ocean Conservancy

PMI & DMI – Peso Médio Inicial & Diâmetro Médio Inicial

RAS – Recirculating Aquaculture Systems

TAN – Total Ammonia Nitrogen

TCD, TCE & TCR – Taxa de Crescimento Diário, Taxa de Crescimento Específica & Taxa de Crescimento Relativa

WWF – World Wild Fund for Nature

1. Introdução

1.1 Aquacultura

A combinação entre o crescente aumento da população mundial, e a incessante procura e demanda por produtos de qualidade provenientes do mar, tem vindo a provocar danos e impactos ecológicos nas espécies mais procuradas, levando à sua sobre-exploração e eventual extinção (Troell, et al., 2014). A necessidade de encontrar novas fontes e fontes alternativas de alimento, que satisfizessem as respetivas necessidades alimentares atuais, no mundo de hoje tornou-se essencial. Neste contexto, a aquacultura passou a ter um lugar de destaque (Figura 1), emergindo como uma alternativa complementar viável à exploração dos recursos no meio natural (FAO, 2014; Focardi, et al., 2005; Troell, et al., 2014; Wartenberg, et al., 2017).

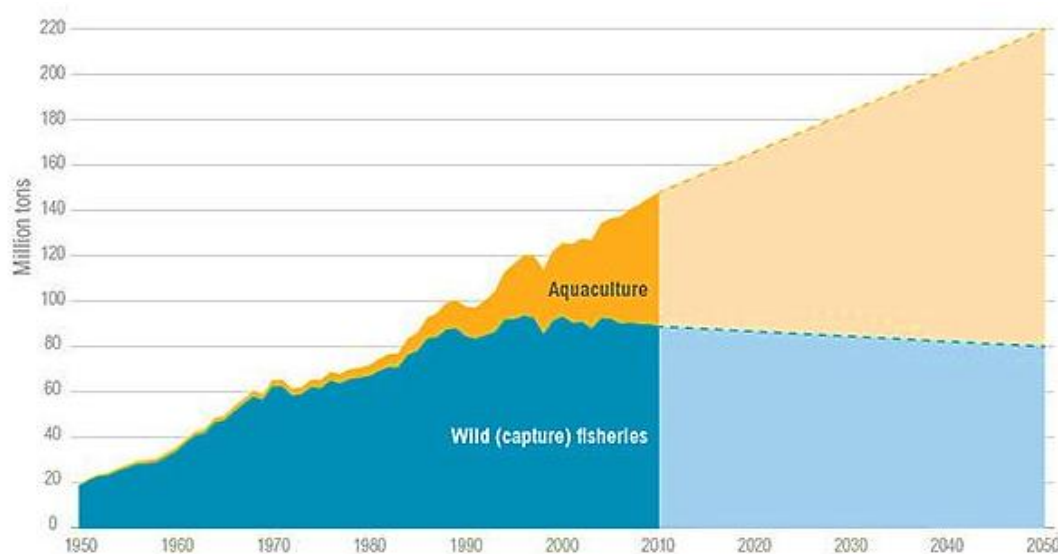


Figura 1 – “Aquaculture is Expanding to Meet World Fish Demand” (Adaptado: FAO, 2016)

A Aquacultura é, por definição, a produção ou cultura de organismos aquáticos, o que implica, de algum modo a intervenção humana, com o objetivo de aumentar a sua produção. Hoje em dia, é cada vez mais frequente recorrer ao uso da aquacultura para produção de peixes e outros organismos aquáticos, especialmente daqueles que já se encontram sobre-explorados, ou com grande interesse comercial e económico.

Perante o panorama atual, em que o peixe e outros bens aquícolas são dos produtos alimentares mais comercializados em todo o mundo, e muito embora seja difícil obter dados concretos, as estimativas indicam que cerca de 650-800 milhões de pessoas dependem, direta ou indiretamente, da pesca e indústrias associadas (Krause, et al., 2015).

Atualmente, a produção em aquacultura é um dos sectores com maior crescimento e expansão das últimas décadas (FAO, 2014; 2016; Wartenberg, et al., 2017).

Concretamente entre os anos 2000 e 2008, verificou-se uma diminuição significativa na taxa de capturas selvagens, quando comparado com anos anteriores, contrastando com a produção em aquacultura que denotou um grande aumento em todos os continentes (Jeffries, 2017; Krause, et al., 2015). Muito embora o ritmo deste crescimento tenha abrandado nos últimos anos, já que a média anual tem vindo a decrescer, o importante papel da aquacultura mantém-se, uma vez que continua a providenciar cerca de 50% do pescado consumido a nível mundial (Figura 2) (Bostock, et al., 2010; FAO, 2014; Jeffries, 2017).

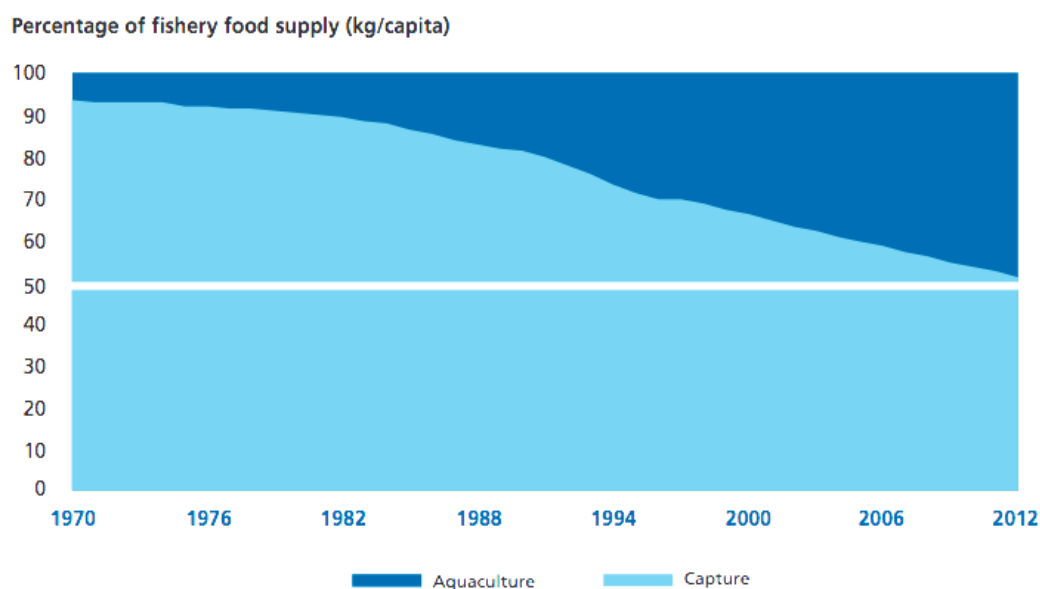


Figura 2 – Peso relativo da contribuição da Aquacultura e das Pescas no consumo de pescado na alimentação mundial (FAO, 2014)

Na Europa Mediterrânica, cujos principais países são a Croácia, França, Grécia, Itália, Eslovénia, Espanha e Portugal; o consumo anual de peixe *per capita* é de 33,4 Kg, valor que quando comparado com a média europeia de 22,9 Kg ou com a média

mundial de 19,2 Kg, é bastante elucidativo da importância e relevância do pescado nestes países. Atualmente nesta região, a aquacultura contribui com cerca de 1/3 do volume de peixe consumido, chegando mesmo, no caso da Grécia e Itália, a exceder o valor das capturas selvagens, refletindo a situação global, onde já mais de metade do pescado total consumido provém da aquacultura (Jeffries, 2017).

No caso concreto de Portugal, o sector da aquacultura representa apenas 3% da produção nacional de peixe, percentagem diminuta e que deixa muito a desejar quando comparada com os 20% que traduz o valor médio europeu (EC, 2012; 2016). De facto, o pescado total em Portugal assegura os valores médios *per capita* europeus, mas fica muito aquém do seu arrebatador consumo *per capita* de 56,8 Kg, que se traduz em mais de 1 Kg de peixe por pessoa todas as semanas (Jeffries, 2017). Várias opressões ao desenvolvimento do sector aquícola português têm contribuído para este cenário. Por exemplo, a incorreta localização das empresas que acaba por limitar a sua expansão e consequentemente produção; o licenciamento e longos processos burocráticos associados a este tipo de empresas; os elevados custos dos terrenos na costa portuguesa, e a própria competição com outros sectores interessados (turismo, desenvolvimento urbano, proteção ambiental, etc.); tudo isto são constrangimentos ao desenvolvimento deste sector no nosso país.

Todavia, está cada vez mais fundamentada e presente a ideia de que a aquacultura é o único meio realista, perante a sobre-exploração e esgotamento atual dos *stocks* selvagens, para que se possa manter e/ou aumentar o volume de peixe produzido na nação mediterrânea (Jeffries, 2017).

Muito embora existam outros regimes de produção aquícola – o extensivo e o semi-intensivo – o intensivo é atualmente o mais usado para a produção em grande escala. Apesar da produção aquícola intensiva ter uma surpreendente taxa de crescimento de 8,3% por ano, desde 1970 (FAO, 2014 & 2016), esta está diretamente associada a possíveis impactos ambientais e/ou ecológicos que podem colocar em causa a sustentabilidade do sector (Bostock, et al., 2010; Martínez-Espiñeira, et al., 2015; Read & Fernandes, 2003; Troell, et al., 2003). Com a sua continua expansão torna-se urgente a procura de práticas mais sustentáveis, que viabilizem a produção do ponto de vista económico e ambiental (Barrington, et al., 2009; Edwards, 2015)

Quando a aquacultura é em terra (*inshore*) e funcionando em sistema de recirculação, uma das maiores preocupações está diretamente associada com a manutenção da qualidade da água dos sistemas; cenário menos preocupante quando esta exploração é feita em mar aberto (*offshore*), onde os maiores problemas estão

associados ao impacto e degradação ambiental nas áreas circundantes, que eventualmente e a longo prazo, irão prejudicar e inibir o crescimento das próprias culturas (Siskey & Baldwin, 2011). A adequação do alimento composto e a gestão da alimentação à espécie a produzir é de elevadíssima importância, no sentido de diminuir a carga poluente da aquacultura intensiva (Edwards, 2015). A eficiência de utilização da proteína e da energia, por exemplo, ronda os 20-40% do ingerido, sendo o restante eliminado para a água, contribuindo enormemente para a elevada carga poluidora da produção intensiva (Marinho, et al., 2013). Assim, hoje em dia, uma das maiores preocupações, entraves e eventuais problemas à produção em aquacultura está diretamente relacionado com a alimentação e dietas formuladas, que não são ingeridas e digeridas na sua totalidade, originando níveis elevados de amónia, nitritos e fosfatos dissolvidos, que provocam, consequentemente, uma eutrofização das águas prejudicando diversas espécies aquáticas, incluindo os próprios peixes (Bostock, et al., 2010; Edwards, 2015; Schneider, et al., 2005). Deste modo, é importante e obrigatória a limpeza e tratamento das águas descarregadas, que atualmente é feito maioritariamente apenas com filtros mecânicos juntamente com filtros biológicos (filtração por bactérias nitrificantes) (Neori, et al., 2004). Estes processos de filtração podem ser complementados, ou até mesmo substituídos, recorrendo ao uso de biofiltros naturais, como por exemplo, as macroalgas (Edwards, 2015). As algas conseguem não só remover grande parte da carga poluidora, já que a matéria inorgânica dissolvida nas águas é essencial para a sua nutrição, como também oxigenam as águas, o que se torna uma mais valia em sistemas de recirculação (Chopin, 2006; Chopin, et al., 2010; Domingues, et al., 2014; Grote, 2016; Neori, et al., 2000; 2004). Um exemplo muito prático, são os sistemas integrados, em que as algas assimilam a amónia excretada pelos peixes, fosfatos e dióxido de carbono, convertendo-os em biomassa potencialmente valiosa, acrescentando ainda que, com este tratamento, os efluentes podem ser reutilizados em sistemas de recirculação ou serem descarregados sem danificar o ambiente (Abreu, et al., 2011).

Face à crescente intensificação da produção aquícola, ao concomitante aumento das descargas de efluentes e ao uso excessivo de recursos, urge a necessidade de mitigar os impactos ecológicos e ambientais desta indústria (Chávez-Crooker, et al., 2010; Focardi, et al., 2005; Read & Fernandes, 2003). O desenvolvimento de sistemas de produção, que permitam uma expansão ambiental e economicamente sustentável da aquacultura a longo-prazo é, portanto, de primordial importância (Al-Hafedh, et al., 2015). A aquacultura multitrófica integrada pode ser considerada uma abordagem adequada e alternativa ao tradicional cultivo intensivo, contribuindo para o aumento da

sustentabilidade ambiental e económica desta mesma indústria (Bostock, et al., 2010; Martínez-Espiñeira, et al., 2015; Soto, 2009).

1.2 Aquacultura Multitrófica Integrada

A aquacultura multitrófica integrada – IMTA (*Integrated Multitrophic Aquaculture*), tal com o nome sugere, implica a integração de diferentes níveis tróficos no mesmo sistema de produção (Bostock, et al., 2010), permitindo alcançar a sustentabilidade ambiental através da biomitigação dos resíduos da aquacultura (Chopin, 2006; Chopin, et al., 2010). Comparativamente com os sistemas de monocultura, os sistemas IMTA apresentam também vantagens económicas e sociais, já que permitem o aumento da diversificação económica, divisão dos riscos e maior aceitação social (Al-Hafedh, et al., 2015; Barrington, et al., 2009; Castelar, et al., 2015; Cunha, et al., 2016; Martínez-Espiñeira, et al., 2015; Neori, et al., 2007).

Um sistema em IMTA não se limita a albergar a coexistência de diferentes espécies, que em muitos casos são do mesmo nível trófico (Ren, et al., 2012). O IMTA é muito mais do que uma policultura (Barrington, et al., 2009). O principal objetivo é a criação de um sistema que seja, não só ambientalmente equilibrado, mas também o mais autossustentável possível, através da recriação do que acontece no meio natural – reproduzindo uma cadeia trófica, sendo que cada nível trófico alimentar-se-á dos desperdícios do nível trófico anterior/superior. Assim, os resíduos de um subsistema, que de outro modo seriam desperdiçados, tornam-se uma mais valia como alimento do subsistema seguinte, permitindo a reciclagem, o aproveitamento e a integração dos mesmos novamente na cadeia alimentar (Bostock, et al., 2010; Chávez-Crooker, et al., 2010; Chopin, 2006; Chopin, et al., 2012; Cunha, et al., 2016; Martínez-Espiñeira, et al., 2015; Neori, et al., 2004; Ren, et al. 2012; Siskey, et al. 2011; Troell, et al., 2009).

Os sistemas em IMTA podem incluir diversas combinações entre diferentes organismos, mas na generalidade dos casos, estes sistemas combinam a produção de Peixes com organismos extrativos, quer de matéria orgânica em suspensão – como Invertebrados Filtradores (bivalves, moluscos, poliquetas, etc.) – quer de matéria inorgânica dissolvida – como as Algas (Figura 3) (Chopin, et al., 2012; Edwards, 2015). É de extrema importância que a combinação entre espécies a produzir seja em proporções adequadas, com o objetivo de maximizar a produção, a qualidade e sustentabilidade do próprio sistema, tendo em consideração os múltiplos e mútuos benefícios para as espécies em cultivo (Alexander, et al., 2015; Al-Hafedh, et al., 2015; Klinger & Naylor, 2012; Neori, et al., 2000).

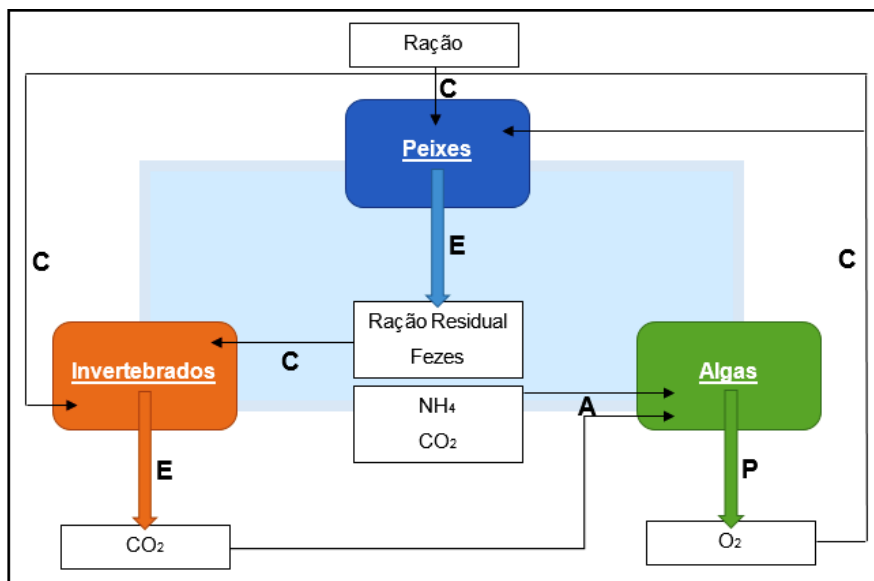


Figura 3 – Esquema representativo de um possível ciclo de nutrientes num sistema IMTA

(A – Absorvem; C – Consomem; E – Excretam; P – Produzem)

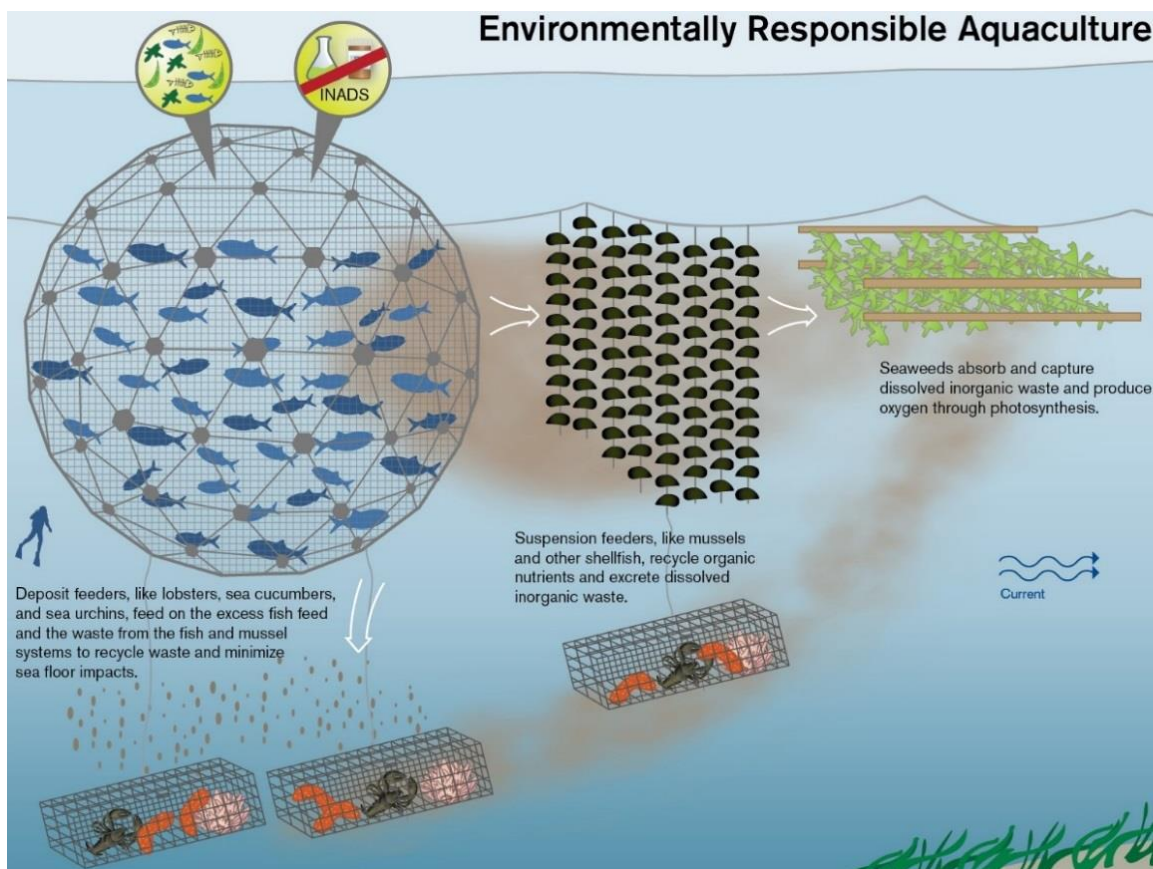


Figura 4 – Esboço ilustrativo do funcionamento em offshore de um sistema IMTA (OC, 2009)

Os sistemas em IMTA podem funcionar tanto em terra e em mar aberto (Figura 4). É mais fácil influenciar e manipular não só as condições dos sistemas, mas também a própria absorção de nutrientes, nos sistemas *inland*, uma vez que, por exemplo, a água que passa nos tanques pode ser novamente reutilizada, ou o próprio fluxo facilmente ajustado e manipulado para melhorar o equilíbrio dos sistemas (Reid, et al., 2011).

A integração das diferentes espécies, cujo crescimento é facilitado pela sua alimentação, que pode ser exclusiva, de desperdícios das outras espécies no sistema, deverá ter em conta o seu eventual potencial económico e aceitação de mercado, aumentando consequentemente o próprio potencial económico do sistema e do cultivo em si (Siskey & Baldwin, 2011). Assim sendo, comparativamente com as monoculturas, os sistemas IMTA apresentam inúmeras vantagens e benefícios (Al-Hafedh, et al., 2015). Para além dos já referidos, como a diversificação das espécies e otimização da gestão e utilização dos recursos; estes, ao mesmo tempo, diminuem o impacto ambiental e social, aumentando a viabilidade económica (Alexander, et al., 2015; Chopin, et al., 2001; Nobre, et al., 2010). A biomitigação (Edwards, 2015) e biorremediação (Bostock, et al., 2010) conseguidas, para além das vantagens económicas obtidas pelo aumento da biomassa e produção em si, acompanhadas pela diminuição dos riscos e custos de manutenção, tornam estes sistemas não só mais rentáveis, mas mais sustentáveis (Ferreira, et al., 2012; Handâ, et al., 2012; Klinger & Naylor, 2012; Troell, et al., 2009; Wartenberg, et al., 2017).

Apesar de todas as vantagens destes sistemas, em relação ao tipo de produção que maioritariamente se pratica nos dias de hoje, ainda existem algumas restrições gerais à implementação dos mesmos. Estas limitações passam sobretudo pela coordenação e otimização das condições de produção para as diferentes espécies a integrar, como é o caso da temperatura do sistema, densidades de produção, entre outras (Bostock, et al., 2010). Acresce ainda a necessidade de um conhecimento especializado relativamente à produção das diferentes espécies, com todas as suas particularidades e desafios (vertebrados, invertebrados, algas e plantas marinhas) (Barrington, et al., 2009; Soto, 2009).

Portanto, num sistema IMTA é necessário, não só selecionar apropriadamente as espécies a produzir, bem como selecioná-las em proporções e densidades de cultivo adequadas, isto para que haja uma complementaridade de processos, tanto químicos como biológicos, no próprio sistema, proporcionando um bom funcionamento ecológico ao mesmo (Barrington, et al., 2009). Assim, as espécies selecionadas para integrar um

sistema IMTA, devem seguir determinadas normas e princípios; entre os quais, devem ser escolhidas:

- Espécies nativas e bem-adaptadas ao local de cultivo, para que não haja o risco que criar espécies invasoras (Barrington, et al., 2009);
- Espécies que estejam de acordo com a regulação e regulamentação de cada local de cultivo (Siskey & Baldwin, 2011).
- Espécies que integrem e completem a cadeia alimentar recriada – por exemplo: que consigam ser alimentadas com os desperdícios de cada uma das espécies anteriores – para que haja um aumento na eficiência do sistema, e um aumento da qualidade da água – não só pela remoção de matéria em suspensão e dissolvida, mas também pelo aumento de oxigénio e diminuição de dióxido de carbono dissolvidos na água (Siskey & Baldwin, 2011);
- Espécies com elevada taxa crescimento, com um ciclo de produção relativamente curto, para que, por exemplo, se tornem um biofiltro eficaz, melhorando a sustentabilidade do sistema (Siskey & Baldwin, 2011);
- Espécies com potencial de mercado e valor económico, para que se torne mais rentável a produção e o negócio, acompanhada por uma diversificação económica das empresas em aquacultura (Chopin, 2006).

Segundo Barrington et al. (2009), em águas temperadas, os principais géneros, com particular interesse e com maior potencial de desenvolvimento em sistemas IMTA, são:

- Peixes – *Salmo* e *Oncorhynchus* (salmonídeos como o salmão e truta); *Scophthalmus* (rodovalho); *Dicentrarchus* (robalo); *Gadus* (bacalhaus); *Anoplopoma* (peixe-carvão-do-pacífico); *Hippoglossus*, *Melanogrammus*, *Paralichthys*, *Pseudopleuronectes* e *Mugil*.
- Macroalgas – *Laminaria*, *Saccharina*, *Undaria*, *Alaria*, *Ecklonia*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Gigartina*, *Sarcothalia*, *Chondracanthus*, *Callophyllis*, *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, *Porphyra*, *Chondrus*, *Palmaria*, *Asparagopsis* e *Ulva*.

- Moluscos – *Haliotis*, *Crassostrea*, *Pecten*, *Argopecten*, *Placopecten*, *Mytilus*, *Choromytilus* e *Tapes*.
- Equinodermes – *Strongylocentrotus*, *Paracentrotus*, *Psammechinus*, *Loxechinus*, *Cucumaria*, *Holothuria*, *Stichopus*, *Parastichopus*, *Apostichopus* e *Athyonidium*.
- Poliquetas – *Nereis*, *Arenicola*, *Glycera* e *Sabella*.
- Crustáceos – *Penaeus* e *Homarus*.

Quanto à escolha das algas, não são só as macroalgas que podem ser utilizadas. As microalgas também servem o papel de biofiltros, tendo como vantagem poderem ser cultivadas com os peixes no mesmo tanque, e serem posteriormente filtradas pela cultura integrada de bivalves filtradores, servindo-lhes ainda de alimento. Porém, as microalgas têm como enorme desvantagem a sua reduzida dimensão, o que torna impossível o seu uso em sistemas IMTA em mar aberto, ou mesmo o controlo da fuga em sistemas IMTA terrestres, podendo causar enormes “blooms” na costa e sendo responsáveis por fenómenos de eutrofização na mesma. Assim, as macroalgas são de facto o biofiltro mais usado.

Na Ásia, particularmente na China, o IMTA é uma prática que tem centenas de anos (Alexander, et al., 2015; Chopin, et al., 2001; Troell, et al., 2009; Ren, et al., 2012), tendo-se disseminado um pouco por todo o mundo, com um potencial de crescimento elevadíssimo. Há variados projetos a decorrer em IMTA em diversos países, na maioria dos casos funcionando à escala experimental ou piloto (Alexander, et al., 2015). Contudo, é cada vez mais comum a existência de países com IMTA a nível comercial ou perto do comercial (Bostock, et al., 2010; Chopin, et al., 2010; Edwards, 2015). Os países que atualmente possuem sistemas IMTA a funcionar a escalas comerciais são: Canadá, Chile, China, Irlanda, África do Sul, Japão, Tailândia, Austrália, Estados Unidos da América, Noruega e Israel (Barrington, et al., 2009).

Apesar dos potenciais benefícios já conhecidos, na Europa, são poucas as empresas especializadas a investir e a trabalhar na área. No entanto, nos últimos anos têm sido muitos os projetos realizados focando o desenvolvimento do IMTA. Este é o caso de um recente projeto de investigação Europeu – *IDREEM* (<http://www.idreem.eu>) – cujo objetivo é proteger, a longo prazo, a sustentabilidade das aquaculturas Europeias, desenvolvendo e demonstrando o potencial dos sistemas IMTA, através da instalação de sistemas à escala experimental em aquaculturas já existentes (Alexander, et al., 2015).

Também em Portugal, foi recentemente aprovado um projeto de investigação – *INSEAFood* – que tem como um dos seus objetivos desenvolver e demonstrar as potencialidades dos sistemas IMTA na região Norte de Portugal; o presente trabalho integra-se neste referido projeto de investigação.

Em Portugal os sistemas em IMTA, envolvendo a produção de peixe e algas em simultâneo têm sido objeto de diversos estudos:

- Matos et al. (2006): Estudo com *Gracilaria bursa pastoris*, *Chondrus crispus* e *Palmaria palmata* recolhidas nas praias de Mindelo e Aveiro, a norte de Portugal, que foram incorporadas em IMTA na Aquacria em Ovar. Este mostrou que, apesar de obter resultados com todas, das três algas estudadas, a *Gracilaria* foi mais eficiente na absorção e remoção de azoto, e obteve uma maior taxa de crescimento que as restantes, sendo então recomendada como boa candidata na integração com o rodovalho (*Scophthalmus maximus*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*).
- Abreu et al. (2011): Estudo com *Gracilaria vermiculophylla*, espécie endémica na ria de Aveiro, que foi integrada em sistema IMTA na Castro & Coelho Lda., na Estela – Póvoa de Varzim, com rodovalho, robalo e linguado (*Solea senegalensis*). A *Gracilaria* é uma das algas mais valiosas que é cultivada mundialmente para a extração de agar e ficocolóides, sendo portanto, economicamente rentável e uma boa candidata a biofiltro em sistemas IMTA, tal como o presente estudo demonstrou. Este concluiu que a alga tem uma boa capacidade de remoção dos nutrientes, do azoto e carbono durante todo o ano, obtendo ao mesmo tempo um bom crescimento em biomassa neste sistema. Conclui ainda que é uma alga de excelente qualidade, não só para a produção de agar, mas também para integração da mesma como ingrediente alternativo às farinhas de peixe a incluir em dietas para alimentar os próprios peixes. Este estudo termina com a conclusão de que a *Gracilaria* é uma ótima aposta e escolha para integrar em IMTA, e com os estudos já realizados está pronta para ser cultivada à escala comercial.
- Marinho et al. (2013): Estudo realizado com *Ulva spp*, produzida em IMTA na Estela – Póvoa de Varzim, como ingrediente a incorporar nas dietas para Tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Foi realizado um ensaio de crescimento e outro de digestibilidade, testando níveis crescentes de incorporação da alga na dieta: 10, 15, e 20%. Após os ensaios, não foram registadas diferenças significativas na

digestibilidade das dietas, ou na composição corporal das carcaças. Este demonstrou que é possível a incorporação de algas de IMTA nas dietas para peixes em substituição da proteína animal, neste caso, esta incorporação poderá ir até 10% sem comprometer a performance de crescimento e utilização do alimento.

- Domingues et al. (2014): Estudo com *Mastocarpus stellatus*, alga endémica a norte de Portugal. A escolha desta alga baseou-se na sua importância e potencial económico associado à extração de carragenanas. Esta foi integrada como potencial biofiltro e biomitigador em sistema IMTA na Estela – Póvoa de Varzim, associada à produção de rodovalho, robalo e linguado. Este estudo demonstrou que esta alga apresenta um potencial mitigador, pois revelou uma capacidade de absorção da amónia de cerca de 50%. Cresceu a um ritmo bastante competitivo, o que leva os autores a concluir que será uma boa aposta para integrar este tipo de sistemas.

Todos estes estudos vêm reforçar que muitas espécies de macroalgas são excelentes candidatas a serem incorporadas em IMTA – funcionam como excelentes biofiltros, pois removem os nutrientes inorgânicos, remediando e mitigando assim os problemas dos efluentes em aquacultura. Por outro lado, estas crescem bem e adaptam-se facilmente a este tipo de sistemas, demonstrando o seu importante potencial económico para aumentar o lucro dos aquicultores; e revelam elevadas taxas de fotossíntese, essenciais para a remoção de dióxido de carbono e aumento da disponibilidade de oxigénio no sistema.

Já em Ílhavo (Aveiro), foi fundada a empresa portuguesa pioneira no cultivo das macroalgas marinhas e produtos derivados, a *ALGAPLUS*. Esta nasceu da vontade de transferir o conhecimento e a experiência de investigadores para um negócio com impacto nos setores da aquacultura, ambiente e biotecnologia. Na *ALGAPLUS* o sistema funciona em IMTA promovendo, mais uma vez, a sustentabilidade da produção aquícola, e esta nova mais valia, que são as macroalgas. As algas são a alma deste negócio e são vendidas para inúmeros fins (Ferreira, 2014).

Em Portugal, à exceção de um estudo levado a cabo por Cunha, et al. (2016), não foram ainda realizados estudos com sistemas em IMTA, envolvendo outras espécies que não peixes e algas. Deste modo, o presente trabalho irá complementar e colmatar a falha de informação existente, quanto à integração de outros organismos como os invertebrados, no sistema.

1.3 Seleção das Espécies

Tendo em conta o que já foi referido anteriormente, as espécies escolhidas para integrar o nosso sistema IMTA (Figura 5), foram particularmente selecionadas de acordo com 3 principais parâmetros:

- A sua temperatura ótima de crescimento, sendo que todas se encontram dentro do mesmo intervalo;
- O seu enquadramento na região;
- A sua importância económica e aceitação.

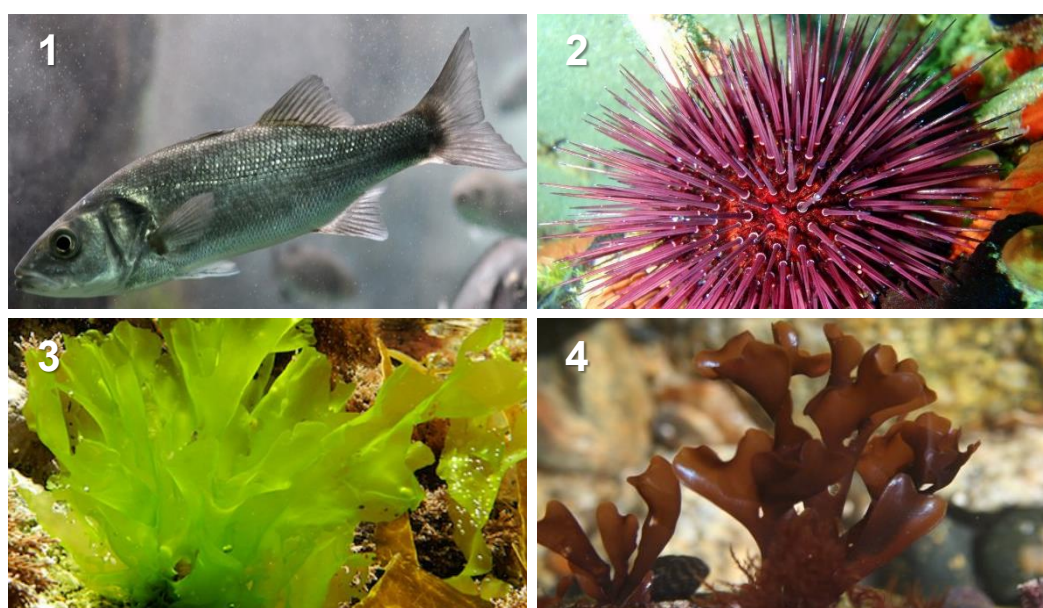


Figura 5 – Exemplos das espécies a integrar no sistema multitrófico integrado (1. Robalo (*Dicentrarchus labrax*); 2. Ouriço-do-Mar (*Paracentrotus lividus*); 3. Alface-do-Mar (*Ulva lactuca*); 4. Musgo-do-Mar (*Chondrus crispus*))

1.3.1 Robalo (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758)

O robalo pertence à classe Actinopterygii, superordem Teleostea, ordem Perciformes e família Moronidae. É uma espécie cuja distribuição geográfica no

Atlântico NE se estende deste da Noruega até Marrocos, Ilhas Canárias e Senegal, bem como nos mares Negro e Mediterrâneo (Fishbase, 2017).

Esta espécie apresenta uma cor cinzento prata no dorso, sendo que nas extremidades, incluindo as barbatanas, se torna um cinza escuro, e um ventre branco brilhante (Figura 6) (FAO, 2017). Os juvenis podem apresentar manchas negras na parte superior do corpo (Fishbase, 2017). A sua fisionomia é alongada, expondo 8 a 10 espinhas dorsais, 12 a 13 raios dorsais, 3 espinhas anais e 10 a 12 raios anais. O opérculo tem a borda posterior finamente serrilhada, a parte interior possui fortes dentículos, e possui 2 espinhas operculares planas (Fishbase, 2017). Estes peixes podem atingir até 1 metro de comprimento e chegar a pesar no máximo 12 Kg. Como são carnívoros vorazes, a sua dieta é fundamentalmente composta por outros pequenos peixes, crustáceos e moluscos (FAO, 2017; WWF, 2017).

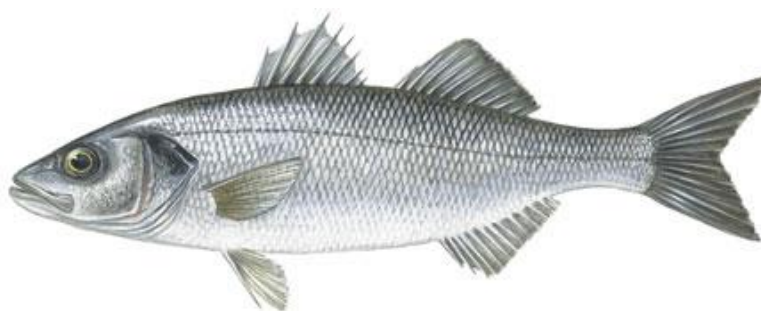


Figura 6 – Robalo Europeu (*Dicentrarchus labrax*) (WWF, 2017)

O robalo habita preferencialmente nas zonas costeiras pouco profundas, de águas batidas e bem oxigenadas, apesar de poder ser encontrado em águas salobras mais protegidas, numa fase de juvenil (Fishbase, 2017).

É um teleósteo marinho, eurialino e euritérmico, pelo é encontrado em condições de salinidade e temperatura muito diversas. Esta espécie tolera águas cujas variações de salinidade vão dos 0,5 até 40‰, e frequenta águas cujas temperaturas podem variar dos 2 a 6°C no Inverno até 32°C no Verão (FAO, 2017). A facilidade de adaptação a diferentes parâmetros e meios faz com que esta seja considerada uma espécie bastante resistente. Contudo, variações ou mudanças demasiado bruscas, podem afetar significativamente a sua capacidade de adaptação, podendo eventualmente levar à sua morte.

Atualmente o robalo apresenta uma enorme relevância a nível comercial e socioeconómico, sendo uma das espécies mais produzidas em aquacultura na região do Mediterrâneo. Grécia, Itália, Turquia e Espanha são os seus principais produtores nesta zona, mas globalmente e nos últimos anos, a sua produção tem vindo ser crescente, chegando mesmo a atingir as 157 449 toneladas no ano 2014 (FAO, 2017).

Em Portugal, esta espécie encontra-se em terceiro lugar no ranking das espécies mais produzidas em águas salobras ou marinhas, com uma produção total anual de 455 toneladas (DGRM, 2015).

1.3.2 Ouriço-do-Mar (*Paracentrotus lividus*, Lamark, 1816)

O ouriço-do-mar é um invertebrado marinho equinoderme que pertence ao filo Echinodermata, e o *Paracentrotus lividus* é uma das numerosas espécies de ouriços pertencentes à classe dos Echinoidea. Esta espécie distribui-se pelas costas do Atlântico NE desde a Escócia e Irlanda até ao Sul de Marrocos, passando pela Grã-Bretanha, Astúrias e Galiza, e ao longo de toda a costa portuguesa, sendo também abundantemente encontrada em todo o Mar Mediterrâneo (Pais, et al., 2007).



Figura 7 – Ouriço-do-Mar (*Paracentrotus lividus*) (Fotografia tirada por Sara Martins)

Esta espécie em particular pode apresentar uma variedade de cores, que vão desde o lilás ou roxo, passando pelo branco, preto, verde, vermelho, castanho, ou até multicolor (Figura 7). Esta variação de cor não está relacionada nem com o sexo ou tamanho do ouriço, diferente alimentação, ou mesmo a profundidade a que vive

(Boudouresque & Verlaque, 2007). Os ouriços apresentam uma forma esférica ou arredondada, de simetria penta-radial, e os ossículos que constituem o seu esqueleto estão totalmente fundidos, formando uma carapaça rígida, que externamente se encontra coberta por numerosos espinhos móveis, mais ou menos longos e pontiagudos. Não possuem olhos, mas estão cobertos por células fotossensíveis. É uma espécie dióica, mas que não apresenta dimorfismo sexual aparente; contudo, é possível diferenciar os sexos pela cor das 5 gónadas que possuem, quando maduras (fêmea apresenta uma cor mais avermelhada enquanto o macho ostenta uma cor mais amarelada) (Biorede, 2017; Boudouresque & Verlaque, 2007; Silva P. , 2012).

A sua deslocação é motivada pelo alimento e estes deslocam-se por ação dos espinhos e dos pés ambulacrários de enorme capacidade adesiva. Os ouriços alimentam-se sobretudo e maioritariamente de algas macrófitas disponíveis no seu habitat, mas também podem ser alimentados com dietas à base de fontes proteicas de origem animal (Cook & Kelly, 2007a; Fernandez & Boudouresque 1998; 2000). A sua alimentação está dependente da lanterna de Aristóteles, localizada ventralmente, cujos dentes são utilizados para cortar pequenos pedaços de alimento introduzidos na boca, ou para raspar algas do substrato. O tamanho máximo que a carapaça pode atingir nesta espécie ronda os 7 cm de diâmetro, e 3 a 4 cm de altura (Biorede, 2017; Boudouresque & Verlaque, 2007; Silva P. , 2012).

Estes ouriços são uma espécie capaz de viver numa grande diversidade de habitats, desde qualquer substrato rochoso, a pradarias, a fundos arenosos ou coralinos; muito embora apareçam maioritariamente ao longo de todo o intertidal rochoso, e preferencialmente até aos 3 metros de profundidade. O *P. lividus* em particular, pode ser encontrado com frequência em buracos auto escavados nas rochas, o que lhes confere proteção contra predadores e abrigo onde as correntes são fortes ou a ação das ondas é intensa; situação facilmente observável na costa portuguesa (Biorede, 2017).

O *P. lividus* apresenta uma elevada tolerância a stresses fisiológicos, sendo capaz de resistir a níveis de secura, salinidade, temperatura ou falta de alimento elevados, quando comparado com outras espécies (Silva P. , 2012).

A apanha de ouriços-do-mar é uma prática com décadas; porém era apenas exercida por um número reduzido de pessoas e pescadores locais, cenário que hoje já não se aplica (Guidetti, et al., 2004). Atualmente, as gónadas dos ouriços são consideradas uma delicada iguaria, reconhecida não só na Ásia, mas já por toda a América, e um pouco por todo o Mediterrâneo, onde são apreciadas como produto

sazonal (McBride, et al., 2004). A crescente procura conduziu à sobre-exploração deste recurso no meio natural, o que por sua vez levou ao desenvolvimento da produção, sob forma intensiva, do ouriço (Equinocultura) (Grosjean, et al., 1998). A frescura, o aspeto físico, a textura e especialmente a cor são os fatores mais importantes na avaliação da qualidade das gónadas; fatores esses, que influenciam fortemente o preço desta iguaria (McBride, et al., 2004). Os preços podem variar entre os 6\$ e 200\$ por Kg, sendo que as gónadas de maior valor comercial são as que apresentam uma cor viva alaranjada (Shpigel, et al., 2005).

Em Portugal, para além desta espécie ser a mais comum e dominante na nossa costa, é também a principal espécie capturada para fins comerciais (Biorede, 2017), o que reflete e evidencia a sua, cada vez maior, importância a nível gastronómico.

1.3.3 Alface-do-Mar (*Ulva lactuca*, Linnaeus, 1753)

A *Ulva lactuca* é uma alga pertencente ao grupo das Algas Verdes, classe Ulvophyceae, ordem Ulvales e família Ulvaceae (Algaebase, 2017; Silva, et al., 2013). A sua distribuição é mundial, sendo que em Portugal, esta espécie está presente um pouco por toda a costa. (Algaebase, 2017; MACOI, 2017).



Figura 8 – Alface-do-Mar (*Ulva lactuca*) (Algaebase, 2017)

Vulgarmente conhecida como alface-do-mar, deve o seu nome comum à real semelhança com as folhas de uma simples alface (Figura 8). Apresenta uma cor que pode ir desde o amarelo-esverdeado, até ao verde escuro, sendo que é mais comum num verde vivo. A sua única fronde de espessura laminar muito fina, já que é apenas constituída por uma ou duas camadas de células no máximo, confere-lhe uma certa translucidez. Esta cresce de forma irregular, mas um tanto ou quanto arredondada, com bordas um pouco enrugadas, e pode apresentar pequenos buracos ou perfurações por toda a sua superfície. Estas algas apresentam uma elevada taxa de crescimento, sendo que podem crescer em diâmetro 20 a 30 cm, embora seja muito frequente encontrar esta espécie em tamanhos mais pequenos (MACOI, 2017). A morfologia externa do género *Ulva* é muito semelhante entre as espécies que o constituem, mas a *U. lactuca* é uma espécie que se consegue diferenciar das demais deste género, por exemplo, pela forma quadrada das suas células constituintes, ou seja, cada célula é tão larga quanto longa.

A alface-do-mar pode ser encontrada em numerosos habitats e diferentes ambientes (Silva, et al., 2013), mas habita preferencialmente baías e zonas protegidas, ou áreas semi-protegidas sem grande turbulência marinha (MACOI, 2017). Uma vez que apresenta uma grande dependência da luz solar (Algaebase, 2017), esta é vulgarmente encontrada em poças ou no meio de rochas no baixo intertidal. A sua fronde conecta-se com os substratos rochosos por um pequeno, quase invisível, discóide, e quando despegada do substrato, esta pode continuar a crescer e formar extensos “tapetes” flutuantes em áreas protegidas (MACOI, 2017).

É uma alga marinha eurialina, uma vez que apresenta uma boa tolerância a diferentes graus de salinidade, podendo mesmo ser encontrada em substratos estuarinos. Apresenta também uma grande tolerância a elevados níveis de temperatura e irradiação luminosa. Está presente todo o ano, sendo mais abundante no Verão e Outono. Pode ser uma espécie oportunista e em certas condições ambientais e ideais pode mesmo chegar a formar “blooms” maciços (MACOI, 2017).

Atualmente, a *U. lactuca* é uma espécie com cada vez mais relevância comercial e económica, utilizada em vários setores e para diversos fins, um pouco por todo o mundo. As variadas aplicações desta espécie vão desde: a alimentação, direta ou indireta, humana e/ou animal, devido às suas propriedades nutricionais, sendo comercializada para este fim de diversas formas (fresca, seca, em flocos, etc.); aos fertilizantes e agricultura; até ao interesse para as indústrias farmacêutica, cosmética, botânica (Chopin 2014, MACOI, 2017; Silva, et al. 2013) e potencialmente da bioenergia:

como biofuel, biogás e outros biomateriais que podem ser gerados a partir não só desta, mas de muitas outras macroalgas (Chopin 2014; Bruhn, et al., 2011).

Hoje em dia, esta espécie está identificada como sendo a candidata ideal, não só para a biofiltração de efluentes piscícolas (Algaebase, 2017; Bem-Ari, et al., 2014; Bolton, et al., 2009; Silva, et al., 2013), mas também para integração em sistemas multitróficos (Algaebase, 2017; Neori, et al., 2004; Neori, et al., 2000). Esta alga tem uma enorme potencial não só a nível de taxas de crescimento, como a nível de valor nutricional, tendo em conta que este está fortemente dependente das condições e altura do ano em que é produzida (Bruhn, et al., 2011), bem como uma grande capacidade de crescer em elevadas concentrações de amónia, fosfato e outros nutrientes, utilizando-os em benefício próprio (Neori, et al., 1996). Além disso, cada Kg de *Ulva* produz por dia, oxigénio suficiente para atender às necessidades de cerca de 2 Kg de peixe. De salientar que o consumo noturno de oxigénio das macroalgas é muito inferior à sua produção diária, chegando mesmo, em algumas espécies, a ser 12 vezes inferior ao produzido (Guerrero, et al., 2012; Neori, et al., 2014). Tudo isto são fatores que demonstram o potencial da alface-do-mar para ser uma excelente candidata a integrar em IMTA.

1.3.4 Musgo-do-Mar (*Chondrus crispus*, Stackhouse, 1797)

O *Chondrus crispus* é uma alga pertencente ao grupo das Algas Vermelhas, classe Florideophycidae, ordem Gigartinales e família Gigartinaceae (Algaebase, 2017). A sua distribuição geográfica é bastante ampla, abrangido todo o Atlântico Norte. No Atlântico NO pode ser encontrada desde Laborador e Províncias Canadianas até New Jersey e Delaware nos EUA. No Atlântico NE pode ser encontrada desde o Norte da Rússia e Noruega até Sul de Espanha, incluindo os Mares Báltico e do Norte, e também no Canal da Mancha. Pode ainda ser encontrada no Mediterrâneo, em Portugal, Açores, Ilhas Faroé e África Ocidental (MACOI, 2017).

Com o nome comum de musgo-do-mar, esta alga apresenta uma cor que pode variar bastante de tonalidade, desde um bordô, vermelho ou vermelho-púrpura iridescente, até uma coloração mais amarelada ou mesmo esverdeada (Figura 9). São algas cartilaginosas de pequeno porte, compostas por um pé ou estipe estreito, que se expande gradualmente para a fronde. O talo, em forma de leque ramificado, é dividido

regular e dicotomicamente, e cresce até um máximo de 15 a 20 cm de comprimento. As suas frondes para além de terem uma cor variável, variam também a nível de ramificação e espessura, no entanto, são normalmente mais espessas no centro do que nas margens; e apresentam ainda axilas arredondadas e ápices mais enrugados (Algaebase, 2017; MACOI, 2017).



Figura 9 – Musgo-do-mar (*Chondrus crispus*) (MACOI, 2017)

O *C. crispus* é uma espécie marinha, que se fixa ao substrato rochoso por intermédio de um pequeno disco basal existente no estipe. Habita em rochas um pouco por todo intertidal e baixo subtidal, ou em poças ou pequenas piscinas formadas na maré baixa (Algaebase, 2017).

Esta é também uma alga com um enorme interesse económico e comercial, sendo especialmente procurada pelos seus hidrocolóides, mais especificamente para a extração de carragenanas (polissacarídeo sulfatado), que posteriormente são usadas, por exemplo, como espessantes numa série de indústrias, incluindo a alimentar, farmacêutica e cosmética. Serve também outros fins, como sendo a alimentação ou aditivo na alimentação, tanto humana como animal, devido às suas propriedades nutricionais e minerais inerentes (MACOI, 2017). A sua apanha comercial apesar de ainda ser bastante praticada, diminuiu abundantemente nos últimos 40 anos, e tudo devido à concorrência de outras fontes de produção deste tipo de algas.

1.4 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de um sistema IMTA, testando os efeitos da integração de espécies distintas, de diferentes níveis tróficos, todas elas com elevado potencial económico e totalmente adaptadas à região. As principais espécies utilizadas foram o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), o ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) e a alface-do-mar (*Ulva lactuca*).

O sistema foi implementado à escala laboratorial, e com os diferentes ensaios realizados, o objetivo foi estabelecer qual a melhor e mais eficaz configuração do IMTA, de modo a otimizar as condições de produção e rendimento das diferentes espécies a integrar.

Este trabalho deverá contribuir para o desenvolvimento da aquacultura sustentável em Portugal, demonstrando também ser possível um aumento do retorno de capital, acompanhado pela diminuição de custos operacionais associados à própria cultura.

2. Material e Métodos

2.1 Sistemas IMTA

Todos os ensaios experimentais que serão descritos nesta dissertação de mestrado, foram conduzidos na estação de Zoologia Marinha da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, em Portugal.

Foram construídos de raiz, à escala experimental e *indoors*, 6 sistemas IMTA iguais e independentes, termorregulados e que funcionam em sistema de recirculação de água. Cada sistema é composto por 4 tanques retangulares de 80L de capacidade, mais 1 tanque com 20L de capacidade. Em cada um dos sistemas, 3 dos tanques maiores destinaram-se a albergar as espécies a integrar. Foi estabelecido um fluxo contínuo de água salgada, em que a água de saída do tanque superior, ou seja, do tanque na posição mais elevada, constitui a água de entrada do tanque seguinte; com a seguinte direção do fluxo: peixes, ouriços, algas, retornando aos peixes e assim sucessivamente (Figura 10). O tanque dos peixes foi desenhado para incluir uma espécie de “armadilha” de matéria particulada, com o objetivo de assegurar a passagem contínua das fezes e restos de alimento para o tanque dos ouriços, e só posteriormente para o tanque das algas.



Figura 10 – Sistema IMTA: Fluxo de Água Peixes → Ouriços → Algas (Fotografia tirada por Sara Martins)

2.2 Ensaio Experimentais

2.2.1 Ensaio de Crescimento

Nos sistemas IMTA (Figura 11) foram realizados dois ensaios de crescimento diferentes, com vista, não só a otimizar as condições de produção das diferentes espécies a integrar, mas também a otimizar o rendimento de cada sistema, tudo sem comprometer as condições de equilíbrio fundamentais ao seu bom funcionamento.

Os parâmetros de temperatura, salinidade, intensidade luminosa e fotoperíodo foram mantidos constantes ao longo de cada um dos ensaios, não sendo alterados de ensaio para ensaio. A temperatura foi termorregulada a 18°C, atendendo, não só ao intervalo ótimo de temperaturas para o desenvolvimento de cada espécie, mas também à temperatura média da água do mar em Portugal. O fotoperíodo selecionado consistiu em 12h de luz e 12h escuridão, e a intensidade luminosa superficial no tanque das algas de, pelo menos, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, reproduzindo um cenário o mais próximo do natural possível.

Antes de qualquer ensaio experimental propriamente dito, todas as espécies passaram por um período de aclimatização às condições experimentais de 15 dias.



Figura 11 – Sistemas IMTA totalmente operacionais (Fotografia tirada por Sara Martins)

a) Ensaio I – Densidade dos Robalos

Com o objetivo de otimizar o funcionamento dos sistemas IMTA, e de modo a obter os melhores resultados possíveis, não só em termos de fluxo/carga de nutrientes no sistema, mas também de aumento de biomassa total das diferentes espécies, no primeiro ensaio, foram testados diferentes níveis de densidade de *stock* para os robalos. Este ensaio teve a duração de 70 dias e decorreu conforme as condições já acima descritas.

A fim de aferir qual a melhor densidade de *stock* para os peixes, no início do ensaio, perante as condições experimentais e seguindo o descrito na literatura (Lupatsch, et al., 2010; Ruyet & Le Bayon, 2009), foram estabelecidas 3 densidades iniciais diferentes, que foram testadas em duplicado: Baixa – BD, 3,5 kg/m³; Média – MD, 7 kg/m³; e Alta – AD, 14 kg/m³, correspondentes a 3, 6 e 12 peixes por tanque (peso médio inicial = 60g).

Em cada um dos sistemas, as densidades de *stock* inicial para os ouriços e para as algas (*Ulva lactuca*), foram as mesmas – 20 kg/m³, correspondente a 25 ouriços por tanque (diâmetro médio inicial = 3,6cm), e 2 kg/m³ respetivamente. Os diferentes grupos formados aleatoriamente para cada uma das espécies foram também, aleatoriamente distribuídos por cada um dos 6 sistemas.

Em todos os sistemas, os robalos foram alimentados à mão até à saciedade aparente, duas vezes por dia, em horário fixo, seis dias por semana, com uma dieta comercial indicada para a espécie (Aquagold, Soja de Portugal; 46% Proteína; 18% Lípidos). Os ouriços, para além dos produtos naturalmente disponíveis no sistema, como as fezes, algum resto de alimento ou microalgas naturalmente presentes nos sistemas, foram ainda alimentados, duas vezes por semana, com algas (*Ulva*) produzidas no próprio sistema IMTA (cerca de 15 g/tanque/semana).

Foi efetuada uma pesagem intercalar de todos os organismos integrados, e no caso das algas, estas foram semanalmente pesadas e a sua biomassa foi sendo reajustada à densidade inicial, a cada 7 dias, conforme descrito por Abreu, et al. (2011), sendo que o excedente serviu para alimentar os ouriços integrados.

No início e no final do período experimental, com vista à avaliação do aumento da biomassa, foi determinado tanto o peso de cada lote de robalos, ouriços e algas, como o diâmetro individual dos ouriços. Para a análise da composição proximal de todos os diferentes organismos, foram retirados aleatoriamente uma amostra representativa

do lote inicial (5 peixes, 10 ouriços e 50g de *Ulva*) e de cada grupo experimental no fim do ensaio (3 ou 5 peixes, 5 ouriços e 50g de *Ulva*), após 1 dia de jejum.

No caso da amostragem dos peixes, procedeu-se à recolha aleatória de 3 exemplares dos dois primeiros sistemas, e 5 exemplares de cada um dos restantes tanques, que foram anestesiados com 2-fenoxietanol (0,3ml/L), pesados e medidos individualmente, recorrendo ao auxílio de uma balança analítica e de uma régua (Figura 12). Posteriormente procedeu-se à colheita de uma amostra de sangue de 3 dos exemplares recolhidos, que juntamente com os restantes foram, de seguida, dissecados e os seus fígados retirados e pesados. O sangue foi imediatamente centrifugado e o plasma congelado a -80°C para posterior análise.



Figura 12 – Amostragem dos Robalos (Fotografia tirada por Ricardo Andrade)

No caso dos ouriços, a amostragem consistiu na recolha de 5 exemplares de cada um dos tanques, que foram também individualmente pesados e medidos (diâmetro e altura) recorrendo ao auxílio de uma balança analítica e de uma craveira. Em cada um deles foi recolhida uma amostra de fluído celómico para posterior análise imunológica, e recolhidas as 5 gónadas com vista a determinação da cor, maturação e sexo do indivíduo, e posterior análise da sua composição (Figura 13). Ao mesmo tempo foi também recolhida uma amostra de fluído celómico de alguns ouriços de uma população selvagem, apanhados na Praia Norte de Viana do Castelo, que mais tarde servirão como

termo de comparação para algumas das análises imunológicas. Também aqui, todo o material reunido foi devidamente etiquetado e guardado a -80°C até posterior utilização.

A amostragem das algas foi muito mais simples, uma vez que consistiu apenas na sua recolha, escorrimento e leve secagem, para posteriormente serem pesadas, e armazenadas e analisadas.



Figura 13 – Amostragem dos Ouriços (Fotografia tirada por Sara Martins)

b) Ensaio II – Taxa de Alimentação dos Ouriços

Com o mesmo objetivo inicial do anterior ensaio, e com base nos resultados obtidos no mesmo, avançamos para um segundo ensaio onde foram testadas diferentes taxas de alimentação para os ouriços. Este segundo ensaio teve a duração de 46 dias e decorreu também nas mesmas condições já acima descritas.

Em todos os sistemas, a densidade de *stock* inicial para os robalos foi de 7 kg/m^3 (densidade ótima que se determinou no Ensaio I), correspondente a 6 peixes por tanque (PMI = 56g), e para os ouriços de 10 kg/m^3 , correspondente a 20 ouriços por cada tanque (DMI = 3,8cm). No caso das algas, as condições foram um pouco diferentes das descritas no primeiro ensaio. Durante este período experimental e com vista a melhor apurar a taxa de crescimento das mesmas, foram colocados livremente na coluna de

água 20 discos de *Ulva*, cada um com 2 cm de diâmetro, em cada um dos sistemas (Figura 14). Em todos os 6 sistemas e juntamente com a *Ulva*, foram ainda colocadas 5 frondes de *Chondrus*, fixas a uma corda colocada junto da superfície de cada tanque.

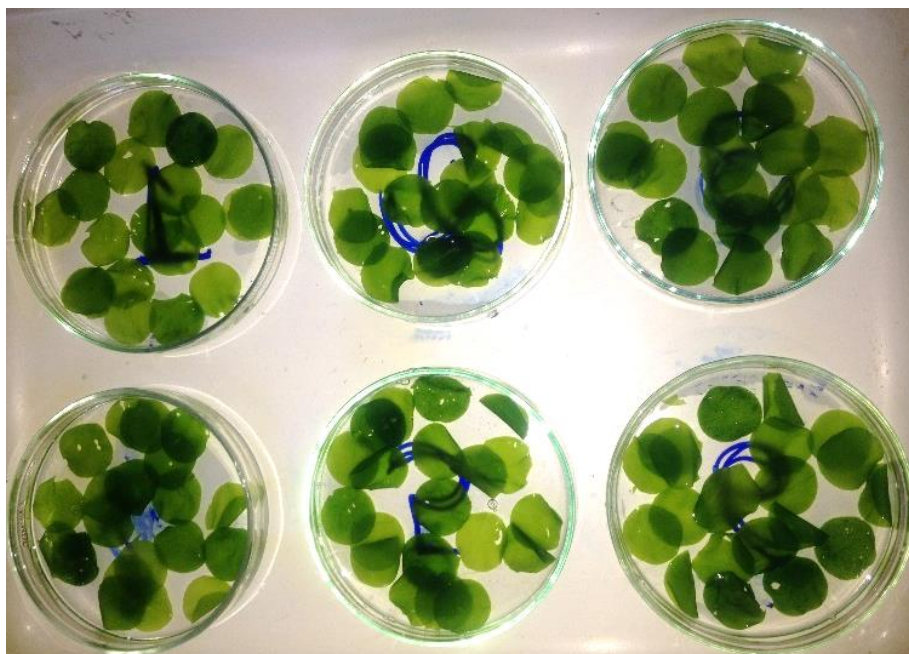


Figura 14 – Discos de *Ulva lactuca* (Fotografia tirada por Sara Martins)



Figura 15 – Dieta preparada em laboratório para a alimentação dos Ouriços-do-Mar (*P. lividus*) (Fotografia tirada por Rui Magalhães)

Os robalos foram alimentados com a mesma dieta e nas mesmas condições descritas no Ensaio I. Já o regime de alimentação dos ouriços foi diferente do anteriormente descrito, sendo que, neste ensaio consistiu numa dieta por nós preparada (Anexo VII), feita de *Ulva* seca e *Agar-Agar* (13% Proteína; 9% Lípidos; 29% NFE) (Figura 15), para além do alimento naturalmente disponível nos sistemas. Realizaram-se vários testes prévios para determinar a razão ótima dos ingredientes a incorporar na dieta, de modo a obter uma dieta capaz de manter a integridade na água por mais de 24h, tendo em consideração que estes organismos se alimentam em contínuo. Foram então estabelecidas 3 taxas de alimentação diferentes, que foram testadas em duplicado: Baixa – 0 g; Média – 30g (1,8% do PMI do tanque dos ouriços); e Alta – 45 g (3% do PMI do tanque dos ouriços) de dieta preparada por semana. Assim, os ouriços foram alimentados 3 vezes por semana, de forma a perfazer as taxas predefinidas, sendo que, no dia seguinte, a ingestão total do alimento era cuidadosamente verificada.

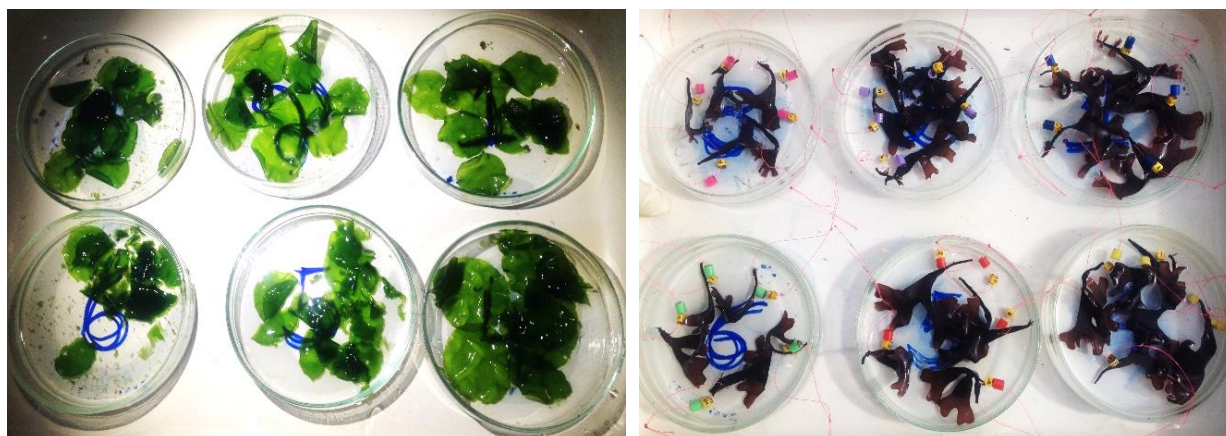


Figura 16 – Recolha das algas para posterior medição e pesagem (Fotografias tiradas por Sara Martins)

No início e no final do período experimental, e mais uma vez com vista à avaliação do aumento da biomassa, foi determinado e medido, tanto o peso de cada lote de robalos, ouriços e algas, como o diâmetro individual total de cada um dos ouriços. No caso das algas, estas eram todas pesadas semanalmente (Figuras 16 e 17). Para tal, os discos de *Ulva* eram gentilmente escorridos e secos com papel absorvente, o seu peso e diâmetro registados com o auxílio de uma balança analítica e régua respetivamente, sendo que eram substituídos por novos discos todas as semanas; já as frondes de *Chondrus*, que inicialmente foram singularmente marcadas, recorrendo ao uso de um sistema de cores e numérico que nos permitisse identificar o tanque

pertencente e fronde respetiva, eram semanalmente pesadas após suavemente secagem e limpeza com papel absorvente.



Figura 17 – Medição dos discos de *Ulva lactuca* (Fotografia tirada por Sara Martins)

c) Ensaio III – Crescimento da *Ulva*

Foi ainda executado um terceiro ensaio de crescimento, que estruturalmente em nada tem a ver com os dois anteriores, e que se realizou em condições que foram também elas diferentes das precedentemente descritas.

Paralelamente ao Ensaio I foi montada uma estrutura à parte dos sistemas IMTA, onde se realizou esta experiência. Este ensaio decorreu num pequeno sistema experimental, constituído por 12 cilindros de acrílico, com 3 L de volume, em que cada um deles foi individualmente alimentado por uma mangueira de água e outra de arejamento. O sistema encontrava-se encoberto por um painel luminoso com intensidade de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que irradiava luz por cima e na lateral de todo o sistema.

O objetivo deste ensaio foi aferir e testar a diferença no crescimento das algas, neste caso da *U. lactuca*, mantidas em monocultura, consoante a água em que estas foram colocadas a crescer – água do mar ou água proveniente dos sistemas IMTA.

No início do ensaio, em cada um dos cilindros foram colocados 4 discos de *Ulva*, com 2 cm de diâmetro cada um, e foram testados em triplicado, 4 tratamentos diferentes. Cada um dos tratamentos diferia na proveniência da água: água proveniente dos sistemas IMTA – baixa, média e elevada densidade de *stock* dos peixes (ver Ensaio I); e água do mar.

As algas foram deixadas a crescer sob intensidade luminosa constante, por um período de 8 dias, ao fim do qual foram retiradas, levemente secas e posteriormente medidas e pesadas.

2.2.2 Ensaio de Digestibilidade

Foram realizados dois ensaios de digestibilidade distintos, um com robalos e outro com ouriços, que visaram a monitorização e quantificação da excreção fecal destes organismos. Estes ensaios acabam não só por servir este propósito, mas ao mesmo tempo poderão funcionar como ensaios de monoculturas, que servirão para posterior análise e comparação de resultados com o IMTA.

a) Ensaio I – Robalos

O ensaio de digestibilidade dos robalos decorreu num sistema experimental, termorregulado, constituído por 6 tanques de fibra de vidro, de 60 L de capacidade, e montados em série, num sistema de recirculação de água com renovação parcial da mesma. Em cada um dos tanques, junto à saída de água, está acoplada uma coluna de sedimentação de fezes, de acordo com o desenho e modelo descrito por Cho, et al. (1982) (Figura 18). As fezes são conduzidas até à coluna de sedimentação pela corrente de água resultante da entrada da mesma na parte superior do tanque, onde aí se depositam (zona terminal), com a água estagnada e onde permanecem até serem recolhidas. Este ensaio teve a duração de 32 dias, e durante o mesmo a temperatura foi mantida constante, e igual à usada nos ensaios em IMTA (18°C).

Inicialmente foram constituídos 6 grupos de juvenis de robalo, provenientes do mesmo lote inicial usado nos ensaios em IMTA, com pesos homogêneos, cada um constituído por 5 espécimes (PMI = 110g), que foram distribuídos aleatoriamente por cada um dos 6 tanques existentes. Estes foram sujeitos a um período de aclimatização de cerca de 15 dias.

Para alimentar os robalos, a dieta comercial usada foi a mesma dos ensaios de crescimento em IMTA, apenas com a diferença da incorporação de um marcador

externo e inerte de digestibilidade (óxido de crómio). A dieta foi finamente moída, a uma granulometria inferior a 0,5mm, e misturada com o óxido de crómio (0,5%) e água (10%), sendo posteriormente granulada a frio, numa granuladora CMP (California Pellet Mill, Crawfordsville, IN, USA), usando uma matriz de 3 mm. Os robalos foram alimentados à mão, até saciedade aparente, duas vezes ao dia (9h e 15h30), 7 dias por semana.

Todos os dias, antes da primeira refeição, as fezes acumuladas e depositadas na coluna de sedimentação eram recolhidas, e imediatamente centrifugadas (3000g) durante 15 minutos, para retirar o excesso de água, para serem por fim congeladas a -20°C, até posterior utilização. Também a cada dia, 30 minutos após a segunda refeição diária, os tanques, tubagens e colunas de sedimentação eram completa e minuciosamente limpos, recorrendo ao auxílio de esponjas, escovas e escovilhões, de modo a remover todo e qualquer resíduo de alimento ou fezes no sistema.

As fezes que foram agrupadas por cada tanque, no final do ensaio foram secas em estufa a 80°C até peso constante, e homogeneizadas para posterior análise.



Figura 18 – Sistema onde decorreu o ensaio de Digestibilidade dos Robalos (Fotografia tirada por Sara Martins)

b) Ensaio II – Ouriços

O ensaio de digestibilidade dos ouriços foi realizado nos sistemas IMTA. Contudo, apenas 3 dos sistemas foram usados para este efeito, sendo que em cada um, dois tanques foram utilizados para incluir os ouriços, e os restantes permaneceram vazios, de modo a que não houvesse qualquer tipo de influência das restantes espécies nos resultados. Este ensaio teve a duração de 21 dias.

Inicialmente foram constituídos 6 grupos homogéneos de 20 ouriços cada (DMI = 3,5cm), que foram distribuídos aleatoriamente pelos tanques respetivos em cada um dos 3 sistemas.

Os ouriços foram alimentados três vezes por semana, com a mesma dieta experimental descrita e usada no Ensaio II, à qual foi também adicionado um marcador inerte (3% de óxido de crómio). No dia da alimentação não se realizaram quaisquer colheitas de fezes. Antes da colheita das fezes, procedeu-se sempre à verificação da ingestão total do alimento, e só posteriormente se procedeu à recolha das fezes, por sifonagem dos fundos de cada um dos tanques.

Tal como no ensaio anterior, imediatamente após a recolha, as fezes foram centrifugadas (3000g) durante 15 minutos, para retirar o excesso de água, e congeladas a -20°C, até posterior utilização.

No final do ensaio, as fezes foram agrupadas por cada tanque, secas em estufa a 80°C até peso constante, e homogeneizadas para posterior análise.

2.3 Análises Químicas

Todas as análises químicas efetuadas no decorrer deste trabalho, foram realizadas de acordo com métodos *standard* e procedimentos habituais (AOAC, 1980), segundo os protocolos em anexo (Anexos I a VI). Antes de qualquer análise, todas as amostras, à exceção do fígado e plasma dos peixes, foram secas em estufa, a 80 - 100°C até peso constante; posteriormente foram finamente moídas de modo a obter amostras o mais homogéneas possível.

2.3.1 Humidade

Num cadinho previamente pesado, foram colocadas aproximadamente 500 mg de amostra. Após secagem em estufa a 105°C, até peso constante, a humidade foi determinada pela perda de peso total da amostra, e expressa em percentagem do peso inicial.

2.3.2 Cinzas

Após a determinação da humidade, as amostras foram incineradas em mufla a 450°C, durante 16h. O conteúdo em cinzas foi determinado como a matéria inorgânica permanente após cremação.

2.3.3 Proteína Bruta

O conteúdo proteico ($N \times 6,25$) foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl, utilizando uma unidade de digestão ácida e de destilação Kjeltex (Tecator Systems, Höganäs, Swede; modelo 1015 e 1026 respetivamente). A proteína bruta foi

calculada multiplicando o conteúdo total em azoto pelo fator 6,25 (16 g Azoto / 100 g Proteína). A proteína bruta foi determinada estimando o conteúdo total de azoto de cada uma das amostras, assumindo que todo o azoto é de origem proteica.

Foram pesadas cerca de 150 mg de amostra para os tubos de digestão, e posteriormente foi adicionada uma pastilha de Kjeldahl (1 g Na₂SO₄ + 0,05 g Se) a cada uma das amostras para servir de catalisador. As amostras foram digeridas a aproximadamente 420°C durante 1 hora, com 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄), que converte o azoto orgânico em sulfato de amónia. Após a digestão, e posterior arrefecimento das amostras já digeridas, estas foram destiladas por arrasto na unidade de destilação Kjeltex, com 25 ml de ácido bórico e indicador de pH, onde a solução é neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) (40%), e o ácido bórico fixa a amónia, formando o borato de amónia. A quantidade de amónia em cada uma das amostras foi determinada por titulação com ácido clorídrico diluído (HCl) (0,1 N).

2.3.4 Lípidos Totais

a) Método de Soxtec

O conteúdo lipídico das dietas e das carcaças dos peixes e algas foi determinado de acordo como método de Soxtec, que consiste na extração contínua com éter de petróleo num sistema Soxtec (Tecator Systems, Höganäs, Sweden; unidade de extração modelo 1043 e unidade de serviço modelo 1046).

Foram pesadas aproximadamente 1 g de amostra para o cartucho de extração, que foi seguidamente posicionado no extrator. As amostras foram fervidas em éter de petróleo a cerca de 120°C, durante 30 minutos; enxaguadas durante 1 hora, e os lípidos extraídos foram completamente coletados nos copos de extração. Após extração, os copos foram colocados na estufa a secar, onde o solvente foi evaporado ficando apenas a gordura extraída. O teor em lípidos foi estimado através da diferença de pesos entre o copo seco antes e após a extração.

b) Método de Folch

O conteúdo lipídico das fezes, gónadas e dos fígados foi determinado de acordo com o método gravimétrico descrito por Folch, et al. (1957).

Foram pesadas cerca de 200 mg de amostra para um tubo, adicionados 4 ml de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), homogeneizado convenientemente no vórtex durante 3 minutos, para posteriormente ser centrifugado a 4000 rpm, durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi decantado para um tubo de centrifuga previamente pesado, onde foi adicionado 1 ml de água destilada e foi a homogeneizar no vórtex. Seguidamente, estes tubos foram centrifugados a 3000 rpm, durante 10 minutos novamente à temperatura ambiente. A camada superior formada foi retirada, e cerca de 1 ml de reagente de Folch (clorofórmio:metanol:água; 3:48:47) foi usado para ajudar a limpar a amostra, sendo que a camada superior foi novamente retirada; este processo foi repetido o número de vezes necessário até obter um amostra sem impurezas. De seguida, à solução restante foi adicionado 0,2 ml de metanol, e o tubo foi deixado a secar durante a noite na estufa a 50°C. Na manhã seguinte, as amostras foram deixadas a arrefecer num exsiccador para posterior pesagem. O teor em lípidos foi calculado através da diferença de pesos entre o tubo seco antes e após a extração.

2.3.5 Óxido de Crómio

O conteúdo em óxido de crómio (Cr_3O_2) das dietas e fezes tanto dos peixes como dos ouriços foi quantificado pela digestão ácida de acordo com a metodologia descrita por Furukawa & Tsukahara (1966).

Foram pesadas 50 mg de amostra, colocadas em pequenos balões de Kjeldahl de 30 ml, onde posteriormente se adicionou 5 ml de ácido nítrico concentrado (HNO_3). Os balões foram colocados numa manta de aquecimento, a 220°C durante aproximadamente 30 minutos (ou até que o volume de ácido fosse reduzido a metade), para que a amostra fosse digerida. Em seguida, adicionou-se mais 5 ml de HNO_3 e repetiu-se o procedimento, para assegurar a digestão completa da matéria orgânica. Após a digestão, os balões foram deixados arrefecer, para se adicionar subsequentemente 3 ml de ácido perclórico (HClO_4), que, no caso de ainda haver

matéria orgânica por digerir nas amostras, ou ainda se encontrarem quentes, pode originar uma reação explosiva. Os balões foram colocados novamente na manta de aquecimento, até que a solução esverdeada mude de cor para amarelo, laranja ou vermelho (ponto em que o Cr_3^+ é oxidado a Cr_6^+) (Figura 19).



Figura 19 – Processo de Oxidação-Redução do Óxido de Crómio. (Fotografia tirada por Sara Martins)

Depois de arrefecidos, e adicionados 10 ml de água destilada, o conteúdo dos balões é transferido para balões volumétricos de 25 ou 50 ml e o seu volume foi perfeito com água destilada (Figura 20). A absorvância das amostras foi lida a 350 nm num espectrofotómetro que foi ajustado usando água destilada como branco. Com a curva padrão obtida pela técnica de oxidação com ácido, o conteúdo em óxido de crómio das amostras foi calculado usando a seguinte curva padrão:

$$y = 0,2089 x + 0,0032$$

Onde o y representa a densidade ótica a 350 nm e x o representa o teor em óxido de crómio da amostra em mg/100 ml.



Figura 20 – Balões volumétricos com as amostras prontas a ser lidas no espectrofotómetro (Fotografia tirada por Sara Martins)

2.3.6 Metabolitos Plasmáticos

De forma a ser possível avaliar a condição fisiológica dos robalos, e já que se trata da realização de um ensaio pioneiro, onde estas espécies partilham o mesmo volume de água, é importante determinar a condição ou estado em que se encontram os nossos peixes. Para tal, realizamos uma análise ao sangue, análise esta, que constitui uma ferramenta rápida e eficaz para identificação de alguns problemas, nomeadamente problemas de stress, de malnutrição ou nutrição deficiente, e problemas patológicos em aquacultura (Peres, et al., 2014).

Para o estudo de cada um dos diferentes metabolitos plasmáticos analisados, foram utilizados *kits* comerciais da empresa *Spinreact*, S.A. (Girona, Espanha). As análises foram feitas seguindo os procedimentos descritos em cada um dos protocolos incluídos nos *kits*. Foram determinados 4 metabolitos plasmáticos: Glucose, determinada por um método enzimático-colorimétrico (*kit* Referência 41011); Colesterol, determinado por um método enzimático-colorimétrico (*kit* Referência 41021); Triglicerídeos, determinados por um método enzimático-colorimétrico (*kit* Referência 41031); Proteínas Totais, determinadas por um método colorimétrico (*kit* Referência 1001291).

As amostras foram colocadas a descongelar em gelo, para seguidamente poderem ser pipetadas em conjunto com o *cocktail* de reagentes (quantidades especificadas na brochura protocolar de cada *kit*). A mistura foi deixada a incubar em

agitador (temperaturas e tempos também especificados na brochura protocolar de cada *kit*), para posteriormente serem pipetados cerca de 200 µl para cada poço de uma microplaca (Figura 21). No final, leu-se a absorvância (Glucose, Colesterol e Triglicerídeos a 505 nm; e Proteínas Totais a 540 nm) de cada uma das microplacas, e os cálculos realizados segundo as fórmulas indicadas nos protocolos.

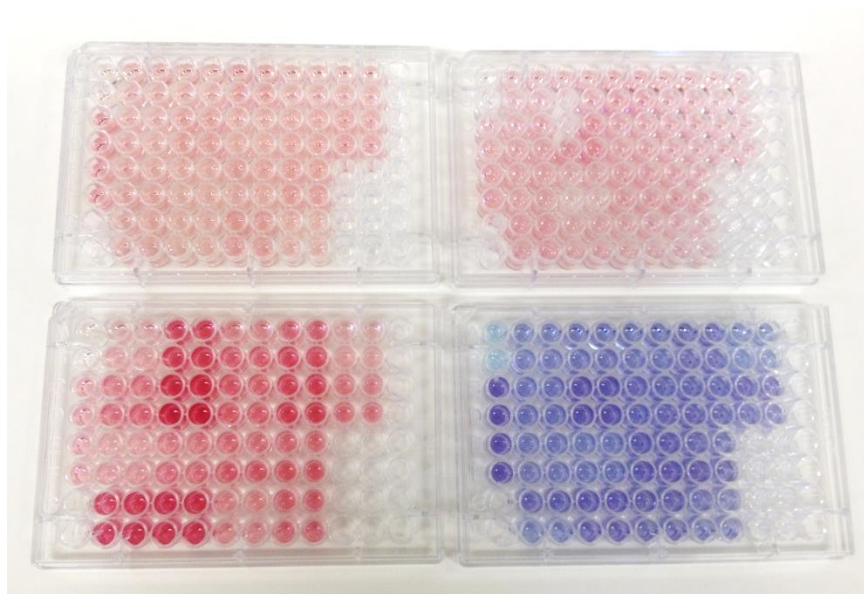


Figura 21 – Determinação de Metabolitos Plasmáticos em Microplacas. (Fotografia tirada por Sara Martins)

2.3.7 Imunologia dos Ouriços

A fim de podermos avaliar o estado imunológico e bem-estar dos ouriços integrados nos nossos sistemas, testamos alguns parâmetros que são capazes de o traduzir. Foi avaliada a atividade bactericida total do fluído celómico recolhido, testada contra *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (*Phdp*), estirpe PP3. Foi também avaliada a capacidade de defesa humoral, através da lisozima, e a atividade hemolítica do fluído celómico dos nossos ouriços juntamente com a amostra da população selvagem (Praia Norte de Viana do Castelo), que servirá como termo de comparação. Todas estas análises seguiram o protocolo descrito por Stabili & Pagliara (2015).

A atividade antibacteriana foi determinada pela incubação da amostra com as referidas bactérias, que em diferentes diluições foram cultivadas em meios de cultivo apropriados. Após 24h de incubação a 24°C, foram contabilizadas as unidades formadoras de colónias (CFU), e a percentagem da capacidade de inibição das amostras foi inferida através da diferença entre o número de colónias emergentes no controlo e nas amostras.

A atividade tipo-lisozima foi avaliada num ensaio padrão com paredes celulares de *Micrococcus lysodeikticus* (bactéria gram positiva) e o fluído celómico dos ouriços em placas de gel de agarose. O diâmetro do halo de inibição produzido foi medido, após uma noite de incubação a 37°C, e comparado com o halo de inibição referência, ou seja, produzido, por exemplo, por uma população de ouriços selvagens.

Para avaliar a atividade hemolítica do fluído celómico foram usados glóbulos vermelhos e a quantificação feita através de espectrofotometria (540nm). As amostras foram previamente incubadas, durante 1h a 37°C, com a suspensão de eritrócitos, e posteriormente centrifugadas durante 5 minutos a 1500g. A lise total foi obtida através da adição de água destilada aos eritrócitos, e o controlo através da solução de eritrócitos juntamente com o tampão. O grau de hemólise (%) foi calculado através da fórmula:

$$[(\text{Abs Amostra} - \text{Abs Controlo}) / \text{Abs Hemólise Total}] \times 100$$

2.4 Procedimentos Analíticos

2.4.1 Peso Médio

$$PM = (PMF - PMI) / 2$$

PM → Peso Médio (g)

PMI → Peso Médio Inicial (g)

PMF → Peso Médio Final (g)

2.4.2 Peso ou Biomassa Adquirida

$$PA = ((PMF - PMI) \times 1000) / (PM \times n^{\circ} \text{ dias})$$

PA → Peso Adquirido (g kg PM⁻¹ dia⁻¹)

2.4.3 Eficiência de Conversão Alimentar

$$ECA = \text{ganho de peso (g)} / \text{alimento ingerido (g MS)}$$

ECA → Eficiência de Conversão Alimentar

MS → Matéria Seca

2.4.4 Taxa de Crescimento Específico ou Relativo

$$TCE = TCR = ((\ln (PMF) - \ln (PMI) / n^{\circ} \text{ dias}) \times 100$$

TCE → Taxa de Crescimento Específico (%) ou TCR → Taxa de Crescimento Relativo (%)

2.4.5 Taxa de Crescimento Diário

$$\text{TCD} = ((\text{PMF}^{1/3} - \text{PMI}^{1/3}) \times 100) / \text{n}^\circ \text{ dias}$$

TCD → Taxa de Crescimento Diário (%)

2.4.6 Coeficiente de Eficácia Proteica

$$\text{CEP} = (\text{PMF} - \text{PMI}) / \text{ingestão proteica (g MS)}$$

CEP → Coeficiente de Eficácia Proteica

2.4.7 Coeficiente de Digestibilidade Aparente

$$\text{CDA} = (1 - (\text{ID} \times \text{NF}) / (\text{IF} \times \text{ND})) \times 100$$

CDA → Coeficiente de Digestibilidade Aparente (%)

ID → Quantidade de Cr_2O_3 na Dieta (%)

IF → Quantidade de Cr_2O_3 nas Fezes (%)

ND → Quantidade de Nutrientes na Dieta (%)

NF → Quantidade de Nutrientes nas Fezes (%)

2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao uso do pacote de software SPSS 21.0 para Windows. Os dados foram expressos sobre a forma de médias e erro padrão da média. A normalidade e homogeneidade de variância das várias variáveis foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente, e em caso de necessidade, procedeu-se à normalização (transformação logarítmica ou raiz quadrada do arco-seno para os valores percentuais). A análise estatística dos dados foi efetuada através de uma análise de variância de uma via – *One-Way ANOVA* – e as diferenças entre médias determinadas pela aplicação do teste de comparação múltipla de Tukey, com um nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1 Ensaio de Crescimento

Na tabela 1 encontra-se descrita a composição química proximal de todo o alimento exógeno, utilizado para o crescimento e manutenção dos organismos integrados em IMTA no decorrer de todos os ensaios: dieta comercial utilizada para alimentar os robalos; algas (*Ulva*) excedentes, provenientes da produção em IMTA, utilizadas para alimentar os ouriços no decorrer do Ensaio I; e dieta preparada à base de *Ulva* seca e *agar-agar*, utilizada para alimentação dos ouriços no decorrer do Ensaio II.

Tabela 1 – Composição Química Proximal da Dieta Comercial usada na alimentação dos Robalos (*Dicentrarchus labrax*) (% Matéria Seca); das Algas Frescas (*Ulva*) (% Matéria Fresca) e Dieta Preparada (% Matéria Seca) utilizadas para alimentar os Ouriços (*Paracentrotus lividus*) no decorrer do Ensaio I e II, respetivamente

| | Dieta Comercial | Algas Frescas | Dieta Preparada |
|--------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Matéria Seca | 92,4 | 22,0 | 7,20 |
| Proteína | 46,0 | 5,83 | 12,9 |
| Lípidos | 18,1 | 1,17 | 8,79 |
| Cinzas | 7,36 | 4,83 | 49,4 |

3.1.1 Ensaio I – Densidade dos Robalos

Durante o Ensaio I todos os organismos integrados responderam bem às condições testadas, sem que se observassem sinais externos de stress, possível doença ou mortalidade.

Os resultados deste ensaio, referentes à performance de crescimento e utilização do alimento de todas as espécies, estão apresentados na Tabela 2. Tanto a taxa de crescimento, como a ingestão voluntária de alimento, a eficiência de conversão alimentar (ECA), o coeficiente de eficácia proteica (CEP) e o índice hepatossomático

dos robalos, não foram afetadas pelas diferentes densidades de *stock* dos mesmos. O mesmo já não se verificou com os ouriços. Neste caso, aqueles que foram integrados nos sistemas com a densidade média de robalos (MD - 7 kg/m³) apresentam um crescimento superior, uma vez que o ganho de diâmetro (%DMI) e taxa de crescimento diário (TCD), de 38,4% e 0,25 respetivamente, foram significativamente maiores quando comparados com os restantes grupos experimentais. Quanto à sua ECA e índice gonadosomático, estes não sofreram alterações. A taxa de crescimento relativa (TCR) das algas, não foi afetada pelas distintas densidades de robalo testadas.

Tabela 2 – Performance do Robalo (*Dicentrarchus labrax*), Ouriço-do-Mar (*Paracentrotus lividus*) e Alface-do-Mar (*Ulva lactuca*) no final do Ensaio I ¹

| Densidade kg/m ³ | Baixa 3,5 | Média 7 | Alta 14 | EPM ² |
|--|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | | | | |
| Peso Médio Inicial (g) | 60,4 | 60,1 | 60,0 | 0,20 |
| Peso Médio Final (g) | 88,9 | 95,7 | 97,2 | 6,34 |
| Peso Ganho (%PMI) | 47,4 | 59,0 | 62,1 | 10,5 |
| Taxa de Crescimento Diário (%) | 0,76 | 0,92 | 0,96 | 0,15 |
| Ingestão (g MS kg PM ⁻¹ dia ⁻¹) | 10,3 | 10,5 | 10,3 | 0,75 |
| Eficiência de Conversão Alimentar | 0,50 | 0,58 | 0,63 | 0,05 |
| Coeficiente de Eficácia Proteica | 1,07 | 1,25 | 1,35 | 0,11 |
| Índice Hepatosomático | 1,31 | 1,69 | 1,48 | 0,09 |
| <i>Paracentrotus lividus</i> | | | | |
| Diâmetro Médio Inicial (cm) | 3,64 | 3,64 | 3,64 | 0,00 |
| Diâmetro Médio Final (cm) | 4,90 ^{ab} | 5,04 ^b | 4,43 ^a | 0,13 |
| Diâmetro Ganho (%DMI) | 34,5 ^{ab} | 38,4 ^b | 21,5 ^a | 3,47 |
| Taxa de Crescimento Diário (%) | 0,23 ^{ab} | 0,25 ^b | 0,15 ^a | 0,02 |
| Ingestão (g MF kg DM ⁻¹ dia ⁻¹) | 28,3 | 28,0 | 26,3 | 0,98 |
| Eficiência de Conversão Alimentar | 0,12 | 0,16 | 0,12 | 0,03 |
| Índice Gonadosomático | 5,59 | 7,62 | 7,14 | 0,58 |
| <i>Ulva lactuca</i> | | | | |
| Taxa de Crescimento Relativa (%/dia) | 2,42 | 3,19 | 3,00 | 0,23 |

¹ANOVA de Uma-Via: Resultados apresentados na mesma linha com diferentes letras superiormente atribuídas são significativamente diferentes (p < 0,05).

²EPM: Erro Padrão da Média

Os dados biométricos resultantes da composição química proximal tanto da carcaça dos robalos, das gónadas dos ouriços, como das algas, encontram-se retratados na Tabela 3. No final do Ensaio I, a conteúdo ou teor proteico, lipídico e em cinzas, não foram afetados pelas diferentes densidades de *stock* testadas neste ensaio,

uma vez que não se verificam quaisquer diferenças significativas entre grupos experimentais.

Tabela 3 – Composição Corporal Proximal (% Matéria Fresca) dos Robalos (*Dicentrarchus labrax*), Gónadas dos Ouriços-do-Mar (*Paracentrotus lividus*), e das Algas (*Ulva lactuca*), no Início e Final do Ensaio I ¹

| Densidade kg/m ³ | Inicial | Baixa 3,5 | Média 7 | Alta 14 | EPM ² |
|-------------------------------------|---------|--------------|------------|------------|------------------|
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | | | | | |
| Matéria Seca | 28,8 | 29,1 | 32,7 | 33,0 | 0,96 |
| Proteína | 16,9 | 16,8 | 16,6 | 17,3 | 0,15 |
| Lípidos | 8,04 | 7,72 | 13,4 | 10,2 | 1,43 |
| Cinzas | 5,94 | 5,14 | 4,42 | 3,78 | 1,26 |
| <i>Paracentrotus lividus</i> | | | | | |
| Matéria Seca | 18,0 | 17,8 | 17,4 | 16,0 | 0,65 |
| Proteína | 8,17 | 8,13 | 7,31 | 7,35 | 0,24 |
| Lípidos | 2,18 | 3,54 | 3,25 | 1,98 | 0,25 |
| <i>Ulva lactuca</i> | | | | | |
| Matéria Seca | 17,9 | 22,0 | 22,6 | 21,5 | 0,59 |
| Proteína | 5,65 | 5,79 | 5,90 | 5,81 | 0,04 |
| Cinzas | 4,81 | 4,28 | 5,46 | 4,76 | 0,30 |

¹ANOVA de Uma-Via: Resultados apresentados na mesma linha com diferentes letras superiormente atribuídas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

²EPM: Erro Padrão da Média

No plasma recolhido aquando da amostragem, procedeu-se à análise dos respetivos metabolitos plasmáticos, cujas concentrações se encontram apresentadas na Tabela 4. Não se verificam diferenças de significância relevante entre os distintos tratamentos para nenhum dos metabolitos testados, tal como se pode comprovar pela observação do gráfico da Figura 22.

Tabela 4 – Metabolitos Plasmáticos dos Robalos (*Dicentrarchus labrax*) no Final do Ensaio I ¹

| Densidade kg/m ³ | Baixa 3,5 | Média 7 | Alta 14 | EPM ² |
|------------------------------------|--------------|------------|------------|------------------|
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | | | | |
| Glucose (mg/dl) | 66,3 | 66,4 | 72,4 | 3,30 |
| Colesterol (mg/dl) | 159,6 | 143,4 | 134,0 | 8,27 |
| Triglicerídeos (mg/dl) | 423,6 | 334,4 | 329,5 | 40,3 |
| Proteínas Totais (g/dl) | 4,07 | 4,38 | 4,40 | 0,20 |

¹**ANOVA de Uma-Via:** Resultados apresentados na mesma linha com diferentes letras superiormente atribuídas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

²**EPM:** Erro Padrão da Média

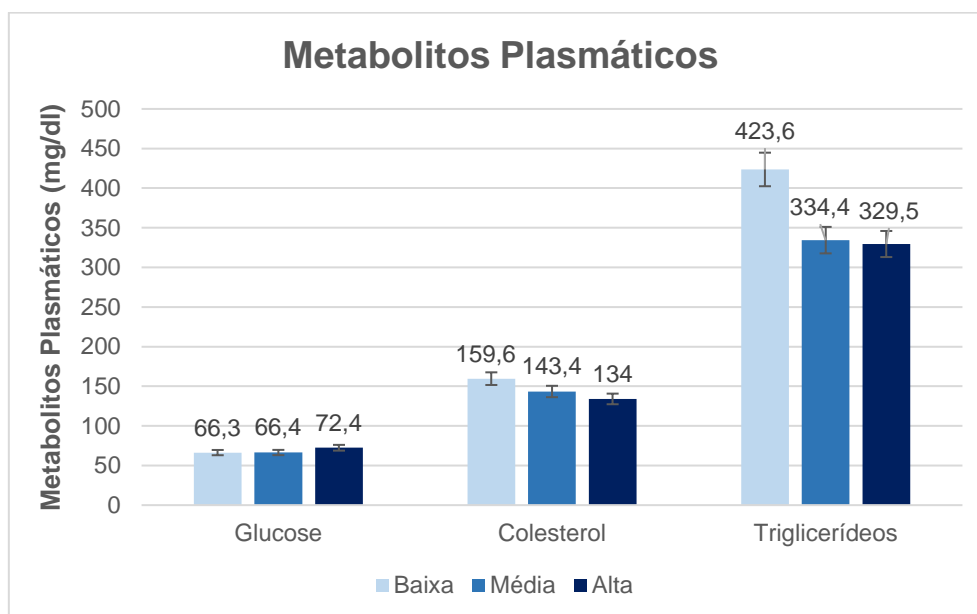


Figura 22 – Gráfico que traduz o Nível de Metabolitos Plasmáticos (mg/dl) nos Robalos (*Dicentrarchus labrax*) Integrados no Ensaio I (Média \pm Desvio Padrão; Colunas com letras diferentes atribuídas são significativamente diferentes (ANOVA $p < 0,05$))

No fluido celômico recolhido na amostragem dos ouriços foi avaliada a atividade bactericida total, testada contra *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (Phdp), estirpe PP3 (Figura 23). Perante os resultados obtidos, podemos verificar que a atividade bactericida é similar entre tratamentos, não se registando diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das respostas testadas. Foi também avaliada a capacidade de defesa humoral através da atividade tipo-lisossima, e a atividade hemolítica no fluido celômico destes organismos (Figura 24). A concentração de lisozima ($\mu\text{g/ml}$) foi idêntica entre os diferentes tratamentos, mostrando que a resposta imunológica não foi comprometida (Figura 24B). A atividade hemolítica também não foi afetada pelas diferentes densidades de stock de robalo testadas, e ao mesmo tempo foi igualmente bastante semelhante à das populações selvagens de ouriços, recolhidos na Praia Norte (Viana do Castelo) (Figura 24A).

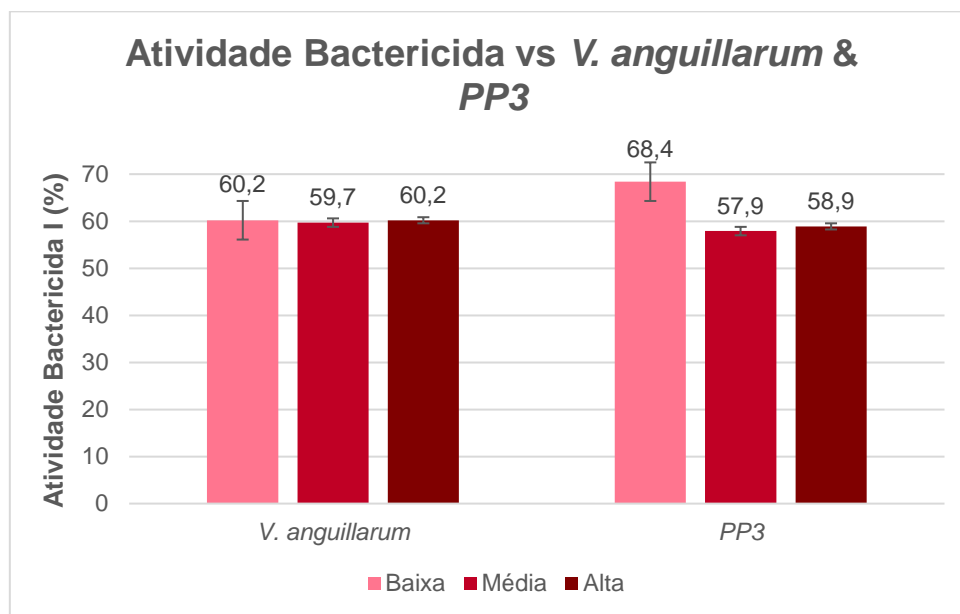


Figura 23 – Gráfico que traduz a Atividade Bactericida I contra *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela* subsp. piscicida (Phdp), estirpe PP3 dos Ouriços-do-Mar (*Paracentrotus lividus*) integrados no Ensaio I (Média \pm Desvio Padrão; Colunas com letras diferentes atribuídas são significativamente diferentes (ANOVA $p < 0,05$))

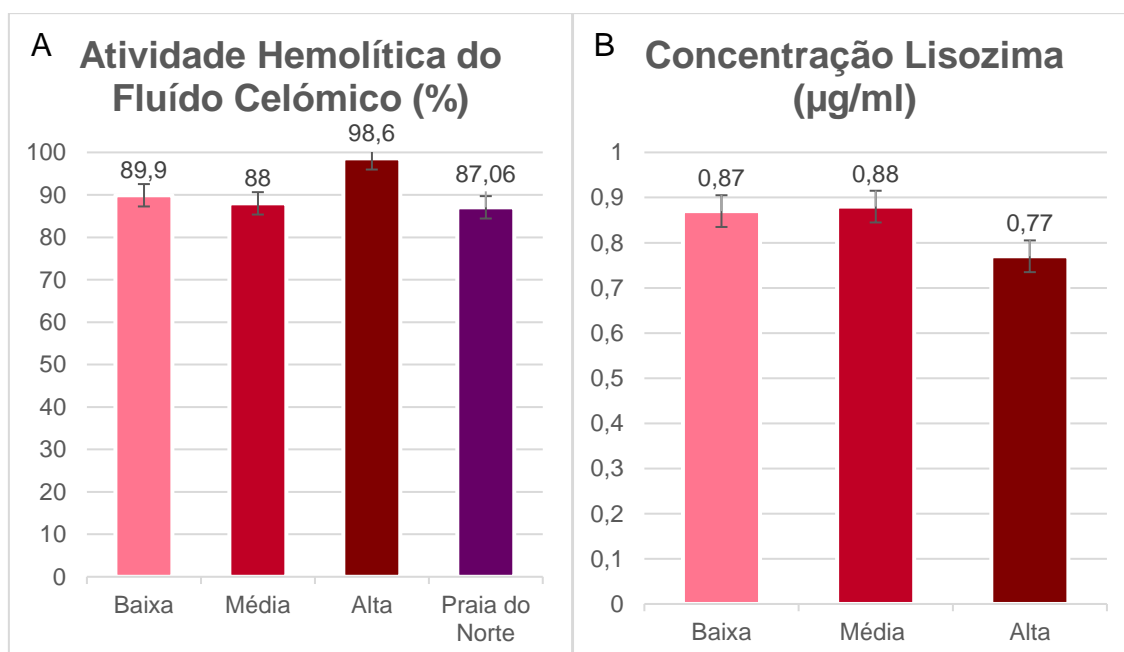


Figura 24 – Gráficos que traduzem A: Atividade Hemolítica do Fluido Celómico (%) B: Concentração de Lisozima (µg/ml), dos Ouriços-do-Mar (*Paracentrotus lividus*) que integraram o Ensaio I (Média \pm Desvio Padrão; Colunas com letras diferentes atribuídas são significativamente diferentes (ANOVA $p < 0,05$))

3.1.2 Ensaio II – Taxa de Alimentação dos Ouriços

Durante o Ensaio II, tal como havia já acontecido no ensaio anterior, todos os organismos integrados responderam bem às condições testadas, sem que se observassem sinais externos de stress, possível doença ou mortalidade.

Os resultados deste ensaio, referentes à performance de crescimento e utilização alimentar de todos as espécies integradas, estão apresentados na Tabela 5. O crescimento, a ingestão voluntária de alimento e a eficiência de conversão alimentar (ECA) dos robalos não foram afetados pelas diferentes taxas de alimentação dos ouriços. No caso dos ouriços, aqueles que foram alimentados com a maior taxa de alimento (45g/semana), apresentaram não só um ganho de peso e diâmetro final significativamente maiores que os restantes grupos experimentais, bem como uma maior taxa de crescimento diário (TCD), de 0,46. A ingestão voluntária dos ouriços foi maior nestes sistemas, contudo, não houve alterações significativas na sua ECA.

Tabela 5 – Performance do Robalo (*Dicentrarchus labrax*), Ouriço-do-Mar (*Paracentrotus lividus*), Alface-do-Mar (*Ulva lactuca*) e Musgo-do-Mar (*Chondrus crispus*), no final do Ensaio II ¹

| Taxa de Alimentação Semanal g | Baixa 0 | Média 30 | Alta 45 | EPM ² |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | | | | |
| Peso Médio Inicial (g) | 55,5 | 54,9 | 57,5 | 6,89 |
| Peso Médio Final (g) | 61,5 | 60,5 | 62,3 | 4,47 |
| Peso Ganho (%PMI) | 9,91 | 12,1 | 8,54 | 10,5 |
| Taxa de Crescimento Diário (%) | 1,31 | 1,56 | 1,14 | 0,15 |
| Ingestão (g MS kg PM ⁻¹ dia ⁻¹) | 10,7 | 9,10 | 7,92 | 0,75 |
| Eficiência de Conversão Alimentar | 0,52 | 0,74 | 0,60 | 0,05 |
| Coeficiente de Eficácia Proteica | 1,22 | 1,35 | 1,27 | 0,11 |
| <i>Paracentrotus lividus</i> | | | | |
| Diâmetro Médio Inicial (cm) | 3,77 | 3,77 | 3,77 | 0,00 |
| Diâmetro Médio Final (cm) | 4,03 ^a | 4,17 ^{ab} | 4,26 ^b | 0,05 |
| Diâmetro Ganho (%DMI) | 6,70 ^a | 10,5 ^{ab} | 16,1 ^b | 2,00 |
| Peso Médio Inicial (g) | 26,4 | 26,1 | 28,1 | 0,44 |
| Peso Médio Final (g) | 27,3 ^a | 27,5 ^a | 30,3 ^b | 0,65 |
| Taxa de Crescimento Diário (%) | 0,21 ^a | 0,29 ^{ab} | 0,46 ^b | 0,02 |
| Ingestão (g MF kg DM ⁻¹ dia ⁻¹) | - | 8,50 ^a | 11,5 ^b | 2,17 |
| Eficiência de Conversão Alimentar | - | 1,76 | 1,94 | 0,39 |

Ulva lactuca

| | | | | |
|--------------------------------------|------|------|------|------|
| Taxa de Crescimento Relativa (%/dia) | 16,9 | 15,5 | 15,4 | 0,35 |
|--------------------------------------|------|------|------|------|

Chondrus crispus

| | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------|
| Taxa de Crescimento Relativa (%/dia) | 2,48 ^b | 2,21 ^{ab} | 1,56 ^a | 0,17 |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------|

¹ANOVA de Uma-Via: Resultados apresentados na mesma linha com diferentes letras superiormente atribuídas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

²EPM: Erro Padrão da Média

Quanto às algas integradas e comparando as suas taxas de crescimento relativas (TCR), podemos verificar uma enorme diferença entre as espécies testadas (Figura 25). A *U. lactuca* apresenta uma TCR superior à do *C. crispus*, e o seu crescimento não foi afetado pelas diferentes taxas de alimentação dos ouriços. O mesmo não se verificou para o *C. crispus*, já que a sua TCR revelou ser afetada negativamente pelo aumento da taxa de ingestão dos ouriços; sendo que, quando comparamos os sistemas de baixa taxa de alimentação (0g/semana) e alta taxa de alimentação (45g/semana), a sua TCR diminui para quase metade do valor.

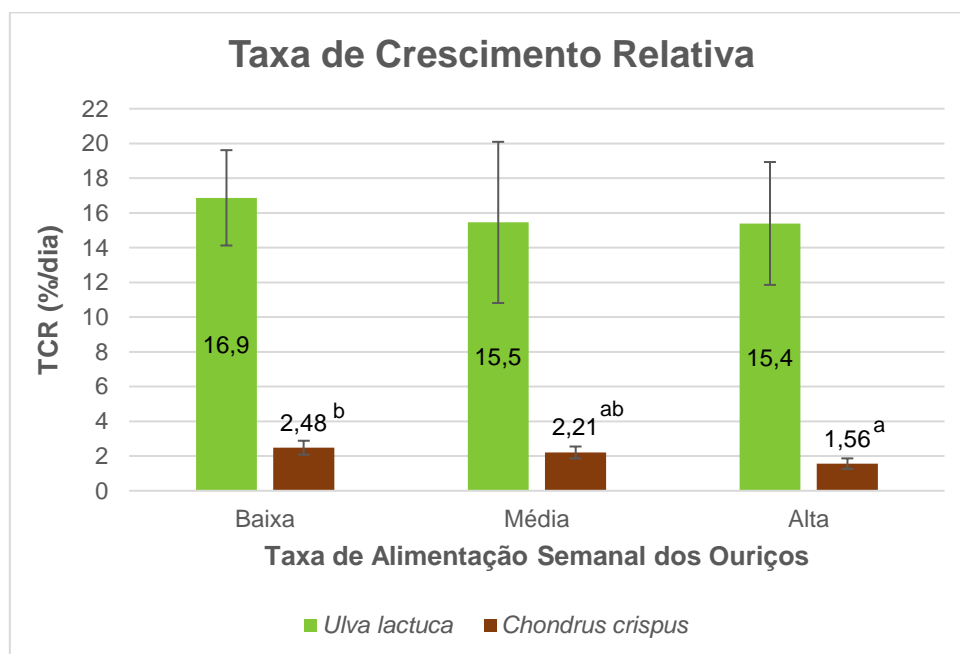


Figura 25 – Gráfico de Comparação das Taxas de Crescimento Relativas (%/dia) das Algas Integradas (*Ulva lactuca* & *Chondrus crispus*) no Ensaio II (Média \pm Desvio Padrão; Colunas com letras diferentes atribuídas são significativamente diferentes (ANOVA $p < 0,05$))

3.1.3 Ensaio III – Crescimento da *Ulva*

Os resultados referentes ao crescimento relativo da *Ulva* no Ensaio III, em que estudamos o efeito da proveniência da água – água do mar e água proveniente dos sistemas IMTA, com diferentes densidades de *stock* para os robalos, aquando do Ensaio I; encontram-se representados no gráfico da Figura 26. Como podemos observar pela análise do gráfico, existem diferenças significativas no crescimento quando comparamos a água proveniente do mar, com as águas provenientes do IMTA, sendo que a TCR das algas é estatisticamente mais elevada quando colocadas a crescer em sistemas IMTA com baixa densidade.

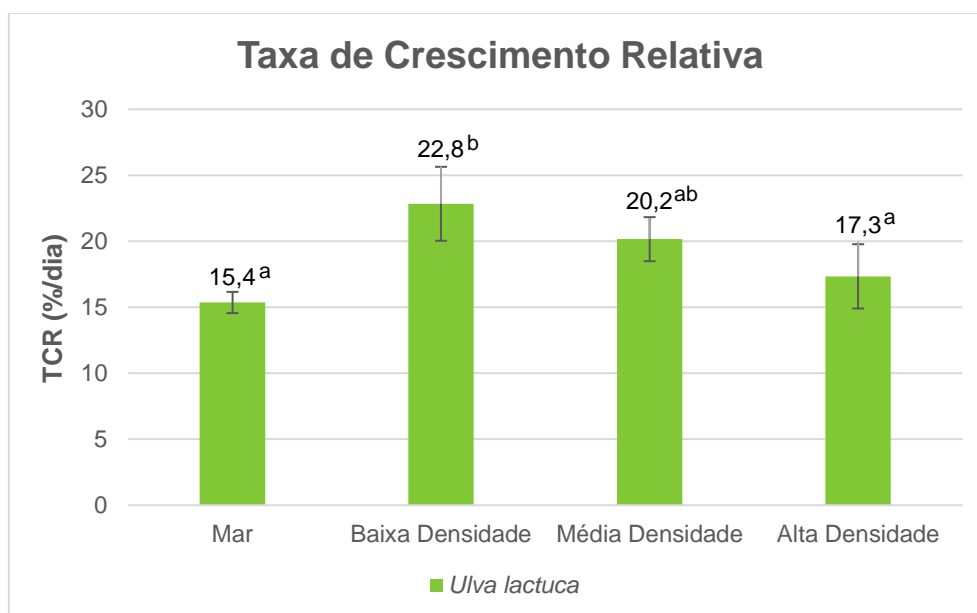


Figura 26 – Gráfico das Taxas de Crescimento Relativas (%/dia) da *Ulva lactuca* nos diferentes Tipos de Águas testadas no Ensaio III (Média \pm Desvio Padrão; Colunas com letras diferentes atribuídas são significativamente diferentes (ANOVA $p < 0,05$))

3.2 Ensaio de Digestibilidade

Na Tabela 6 encontram-se discriminados os valores da composição química proximal das dietas e fezes, utilizadas e recolhidas durante ambos os ensaios de digestibilidade realizados, acompanhados pelo seu coeficiente de digestibilidade aparente (CDA). A quantidade de proteína e lípidos nas fezes é bastante inferior à das dietas, enquanto que para a quantidade de marcador se verifica o inverso. Com base nestes valores foi calculado o CDA, que determina a quantidade (%) de nutriente que é realmente absorvido pelo animal, sendo que os CDA da proteína, em ambos os ensaios, foram bastante elevados (94-97%).

Tabela 6 – Composição Química Proximal (% Matéria Seca) das Dietas e das Fezes, com respetivo Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA) (%) dos Ensaio de Digestibilidade dos Robalos (*Dicentrarchus labrax*) (I) e dos Ouriços (*Paracentrotus lividus*) (II)

| | Ensaio I <i>Dicentrarchus Labrax</i> | Ensaio II <i>Paracentrotus lividus</i> |
|-----------------------|---|---|
| <i>Dieta</i> | | |
| Matéria Seca | 92,4 | 7,20 |
| Proteína | 46,0 | 12,9 |
| Lípidos | 18,1 | 8,79 |
| Cinzas | 7,36 | 49,4 |
| Óxido de Crómio | 0,49 | 2,61 |
| <i>Fezes</i> | | |
| Proteína | 13,1 | 2,35 |
| Lípidos | 3,36 | - |
| Óxido de Crómio | 2,16 | 21,3 |
| <i>CDA (%)</i> | | |
| Matéria Seca | 79,2 | 86,3 |
| Proteína | 94,1 | 97,4 |
| Lípidos | 96,1 | - |

4. Discussão

Para que o setor da aquacultura continue em expansão será necessário reformular ou desenvolver novas práticas e tecnologias inovadoras, e que consigam ao mesmo tempo ser ambientalmente responsáveis. Reduzir os impactos ambientais das atividades ligadas à aquacultura é o processo chave para assegurar a sustentabilidade a longo prazo desta indústria (Troell, et al., 2003).

A aquacultura sustentável deve ser ecologicamente eficiente, ambientalmente benigna, diversificada, rentável e socialmente benéfica (Chopin, et al., 2012, 2013; 2014). A aquacultura multitrófica integrada (IMTA) tem todo o potencial para atingir estes objetivos, simplesmente com a coprodução de espécies de diferentes níveis tróficos, com funções complementares no ecossistema; reproduzindo um pouco o que acontece no meio natural, em que há interações sinérgicas entre espécies, acompanhadas pela complementaridade de processos químicos e biológicos existentes (Neori, et al., 2007; Troel, et al., 2003). Num sistema IMTA, os desperdícios que de outra forma seriam apenas isso, tornam-se uma mais valia para o sistema, sendo reutilizados como alimento e nutrientes para as restantes espécies (Barrington, et al., 2009; 2010).

As vantagens da produção em IMTA comparativamente com monoculturas são, de facto, inúmeras. Contudo, e apesar de nos últimos tempos a demonstração destes benefícios em ambientes controlados ser cada vez maior, na Europa não há ainda uma aposta clara neste tipo de sistemas. No caso concreto do nosso país, Portugal tem reunido esforços para desenvolver esta ideia, com vários estudos já realizados sobre a integração de algas, que inclusivamente já foram aplicados à escala industrial, como é o caso da *ALGAPLUS*. No entanto, o IMTA pode ainda ir muito mais longe com a integração de outras espécies, em particular, espécies de elevado valor comercial, aumentando a rentabilidade do próprio sistema. À exceção de um recente estudo sobre integração de dourada e sargo, com ostras e pepinos do mar, em tanques de terra (Cunha, et al., 2016), não existem outros que estudem mais do que o potencial da integração de macroalgas, para a limpeza de efluentes provenientes de aquaculturas marinhas. Do nosso conhecimento, este trabalho é pioneiro, e o primeiro com o objetivo de estudar e demonstrar a possibilidade de associar a produção de robalos, ouriços e *Ulva* no mesmo sistema IMTA.

4.1 Os Robalos

No primeiro ensaio realizado em IMTA (Ensaio I) decidimos testar 3 diferentes densidades de *stock* para os robalos (BD - 3,5; MD - 7 e AD - 14 kg/m³).

A densidade de *stock* é um fator importantíssimo no setor da aquacultura intensiva, chegando mesmo a ser considerada como tópico prioritário para a investigação nesta área. Ao mesmo tempo, não sendo independente, esta densidade torna-se um fator bastante complexo, isto por envolver a relação entre vários parâmetros, como a qualidade da água, o espaço físico em si, e disponibilidade de alimento. Para além da necessidade do conhecimento para futuras recomendações a aplicar na indústria em si, esta torna-se também uma questão fundamental, não só por ser considerada responsável, em parte, pelo bem-estar animal e pela produtividade do setor, mas igualmente por ser um fator chave e crítico no potencial stress crónico causado nos peixes em cultura, podendo mesmo chegar a afetar a sua fisiologia e comportamentos (Di Marco, et al., 2008; Lupatsch, et al., 2010).

O *Discentrarchus labrax* é uma espécie muito importante em aquacultura, especialmente na área do Mediterrâneo onde é bastante cultivado. A densidade de *stock* comum, para a produção intensiva em monocultura desta espécie, ronda os 30 kg/m³ (Di Marco, et al., 2008). Contudo, em produção integrada o panorama é diferente, uma vez que esta enfrenta outros desafios para além dos encontrados em monoculturas. Em IMTA, o equilíbrio de todas as espécies integradas é essencial, tanto em termos de consumo total de oxigénio, como de carga orgânica e inorgânica da água, fatores estes que são fortemente condicionados pela carga de peixes nestes sistemas. Assim, e visando otimizar o equilíbrio dos nossos sistemas IMTA, este primeiro ensaio teve como objetivo estudar a densidade ótima para robalos, mantidos nestas condições experimentais, optando por testar densidades médias, que melhor se adequam a este contexto, tendo em conta as culturas subsidiárias.

Ao longo dos anos, têm sido alguns os estudos dedicados a examinar o possível efeito de diferentes densidades de *stock* para esta espécie. Papoutsoglou, et al. (1998) testou, para juvenis de robalo, as seguintes densidades de *stock*: 0,5; 1,1; 2,1; e 4,3 kg/m³, tendo demonstrado que a taxa de crescimento dos peixes aumenta com o aumento da densidade, pelo menos até ao valor máximo aqui testado (4,3 kg/m³). Estes resultados talvez possam ser explicados pelo simples facto desta espécie habitualmente viver em cardume, e quando cultivada a tão baixas densidades, a própria densidade de

cultivo acaba por se tornar uma condição stressante, influenciando negativamente a sua performance. No nosso trabalho optamos por utilizar como densidade mais baixa, um valor semelhante ao máximo testado neste ensaio ($3,5 \text{ kg/m}^3$).

No final do Ensaio I, não obtivemos diferenças significativas nem no que diz respeito à performance de crescimento, ingestão voluntária ou eficiência de conversão alimentar (ECA) dos robalos, nem à composição corporal proximal dos mesmos. Para este intervalo de densidades, está descrito que a performance de crescimento, a ingestão voluntária de alimento e a ECA para esta espécie, mantidos em sistemas de monocultura com recirculação de água, não são significativamente influenciadas ou afetadas pelas diferentes densidades a que os peixes são mantidos. Tais resultados poderão estar relacionados com o facto de as densidades testadas serem adequadas, não atingindo nem valores muito altos, nem muito baixos, que poderiam estar diretamente ligados a várias limitações.

Uma vez que este trabalho é inovador na integração do robalo no contexto previamente mencionado, para além da sua performance de crescimento, é importante aferir o estado fisiológico que retrata a condição dos nossos animais. Para tal, procedeu-se à análise de determinados metabolitos plasmáticos como a glucose, colesterol, triglicerídeos e proteínas totais, que funcionam como indicadores secundários do estado fisiológico destes animais. A análise ao sangue é uma ferramenta de rápida identificação de alguns problemas como a malnutrição, o stress ou situações infecciosas em aquacultura (Peres, et al., 2014). No final do ensaio, não foram verificadas quaisquer diferenças significativas no perfil de metabolitos plasmáticos dos robalos mantidos a diferentes densidades de *stock*.

São vários os estudos que demonstram resultados semelhantes aos aqui obtidos, quer a nível de performance, quer a nível fisiológico, observados em robalos produzidos em monocultura. Di Marco, et al. (2008) testou similarmente 3 diferentes densidades de *stock* para juvenis de robalo – 15; 30 e 45 kg/m^3 . Para além do crescimento, tal como no nosso trabalho, neste estudo analisaram os níveis de glucose, colesterol e triglicerídeos no plasma. Não foram verificadas diferenças significativas resultantes das densidades testadas, nem no crescimento, nem na concentração de parâmetros secundários indicadores de stress. Sammouth, et al. (2009) foi ainda mais além e testou as seguintes densidades: 10, 40, 70 e 100 kg/m^3 . Verificou que, ao fim de 63 dias e independentemente do tratamento, a taxa de ingestão diária e a de taxa de crescimento específica foram semelhantes entre os grupos mantidos nas densidades até aos 70 kg/m^3 . Também não existiram diferenças no que respeita a ECA ou à

mortalidade dos robalos. Mais uma vez, o efeito da densidade não foi observado em nenhum dos parâmetros medidores de stress testados no plasma (cortisol, proteína total, glucose, hemoglobina, entre outros). Também d'Orbcastel, et al. (2010) testou as mesmas densidades para juvenis de robalo: 10, 20, 40, 70 e 100 kg/m³, verificando que a performance biológica, a taxa de ingestão diária e a TCE foram significativamente mais baixas nos peixes mantidos à densidade de 100 kg/m³. Num outro estudo, Lupatsch, et al. (2010), testou duas densidades com maior intervalo de diferença entre elas – 5,5 e 36 kg/m³. Neste estudo, tal como nos restantes, o efeito da densidade foi praticamente nulo, não havendo diferenças significativas, nem na performance de crescimento ou ingestão voluntária de alimento dos robalos, nem nos níveis plasmáticos de alguns metabolitos, como o caso da glucose.

Com este primeiro ensaio podemos concluir que, para os robalos mantidos em condições IMTA, não existem quaisquer diferenças relacionadas com as densidades de *stock* que testamos; o que acaba por ir de encontro com a demais literatura e informação disponível sobre o assunto referente à produção desta espécie em monoculturas.

No segundo ensaio realizado em IMTA (Ensaio II), mantivemos constante a média densidade de *stock* dos robalos, e fomos testar diferentes taxas de alimentação para a segunda espécie integrada, os ouriços. A par do Ensaio I, também neste não foram verificadas diferenças na performance dos robalos. Os resultados obtidos mostram que um aporte exógeno de alimento para uma outra espécie integrada, em prol de uma melhor performance, não fará diferença aos peixes, uma vez que estes não serão afetados, pelo menos para as concentrações de alimento testadas.

Em ambos os ensaios realizados demonstramos ser possível a produção de robalo em IMTA, com ouriços e algas, mantendo os animais saudáveis, com uma boa eficiência de retenção alimentar (comprovada pelo ensaio de digestibilidade), e sem comprometer a sua performance geral, evidenciando ainda que esta espécie é uma boa aposta para integrar nestas condições.

4.2 Os Ouriços

No primeiro ensaio realizado em IMTA (Ensaio I), em que foram testadas diferentes densidades para os robalos, os resultados obtidos com os ouriços (*Paracentrotus lividus*) foram diferentes consoante o tratamento. Apesar de obtermos sempre resultados positivos, os ouriços integrados nos sistemas com robalos mantidos à densidade média (MD) tiveram uma melhor performance de crescimento, com resultados significativamente melhores, tanto a nível de percentagem de diâmetro ganho, como a nível de taxa de crescimento diário (TCD). Com base nestes resultados, no segundo ensaio levado a cabo nos sistemas IMTA (Ensaio II), mantivemos a densidade de *stock* dos robalos constante na MD, isto sob o ponto de vista da otimização das condições de produção nos nossos sistemas.

Ainda no Ensaio I, da mesma forma que tentamos melhor avaliar a condição dos nossos peixes, para além da performance de crescimento, fizemos o análogo com os ouriços. Para avaliar o bem-estar e o estado imunológico dos ouriços integrados nos nossos sistemas, analisamos alguns parâmetros que são capazes de o traduzir; nomeadamente a capacidade de defesa humoral através da atividade tipo-lisossima, atividade hemolítica e bactericida total do fluído celómico, esta última contra *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (Phdp), estirpe PP3. No final do ensaio não foram verificadas diferenças entre tratamentos para todos estes parâmetros, mostrando que a capacidade de resposta imunológica dos ouriços não foi comprometida. No caso da atividade hemolítica, até podemos verificar que os valores são bastante idênticos aos da população selvagem encontrada na Praia Norte de Viana do Castelo; demonstrando que em comparação, também nós conseguimos ter uma população de *P. lividus* saudável, mesmo que nestas condições de cultivo.

Foi avaliada a atividade bactericida do fluído celómico dos ouriços, em especial contra duas bactérias, *V. anguillarum* e PP3. Estas são bactérias (*gram* negativas) de elevada importância no setor da aquacultura, não só pela gravidade das doenças causadas, mas também pela sua capacidade de infeção e disseminação. A vibriose e a fotobacteriose, causadas por estes agentes etiológicos respetivamente, são duas graves doenças que afetam uma série de animais marinhos, manifestando-se inclusive em peixes, e nomeadamente no *D. labrax*; com uma ampla distribuição geográfica que abrange Portugal, e são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade, especialmente em peixes de culturas (Chistiakov, et al., 2007; Romalde, 2002).

Apesar de nos últimos anos já existirem pesquisas e estudos sobre a integração do ouriço-do-mar em IMTA, a informação é ainda escassa. Contudo, temos alguns exemplos, como é o caso de Cook & Kelly (2007b), que testaram a integração do ouriço (*P. lividus*) com salmão do Atlântico (*Salmo salar*), em condições de *offshore*. Todavia, testaram esta coprodução a diferentes distâncias. Com este estudo, os autores demonstraram que a integração é possível e viável nestas condições, e mais ainda, que quanto maior for a proximidade entre as diferentes culturas, melhor será toda a performance do ouriço. Após estes resultados, decidiram ir um pouco mais além prolongando o estudo, e testando se, para além do alimento disponível e produzido pela cultura de salmões, com maior quantidade alimento, neste caso alimentando os ouriços com algas (*Laminaria spp.*), melhoraria ainda mais a sua performance de crescimento. Os resultados obtidos apontaram para isso mesmo. Com a sua constante ingestão e apetite voraz, a performance de crescimento conseguiu ainda ser melhor com o aumento da quantidade de alimento disponível. Já Christiansen & Siikavuopio (2007) testaram a influência da ingestão no índice gonadossomático do ouriço verde (*Strongylocentrotus drobachiensis*). Para além de concluírem que existe uma clara relação entre a taxa ingestão e o crescimento das gónadas, sendo que quanto maior a ingestão, maiores gónadas – segundo a equação: $GG = 0,619 FI - 0,097$ ($R^2 = 0,533$, $P < 0,001$); concluem ainda que a melhor densidade de stock para estes ouriços, já com tamanho comercial, é de 7 a 8 kg/m³, sem que haja efeitos adversos na ingestão, no crescimento geral e das gónadas dos mesmos.

Com o primeiro ensaio conseguimos mostrar ser possível e exequível o cultivo de ouriços saudáveis, em regime IMTA, com robalo e algas, sem que seja necessário qualquer tipo de intervenção externa e humana no referido nível trófico do sistema.

No que diz respeito à alimentação do *P. lividus*, tanto o teor proteico, como o teor lipídico são dois fatores principais, e ao mesmo tempo limitantes no seu crescimento (Schlosser, et al., 2005; Hammer, et al., 2006). Neste contexto, no ensaio II decidimos testar 3 taxas de alimentação diferentes para os ouriços (0, 30 e 45 g/semana de alimento). Apesar de no Ensaio I confirmarmos que, mesmo só com o alimento disponível, como as fezes e restos de alimento, juntamente com a diminuta e limitada quantidade de algas (15g/semana), conseguimos o desenvolvimento e crescimento desta espécie, foi com o Ensaio II que realmente potencializamos a sua performance geral. Como seria já de esperar, com a introdução de uma pequena quantidade de alimento (dieta preparada à base de algas) ocorreu um aumento significativo de toda a performance de crescimento dos ouriços. Reid, et al. (2013b) verificou uma situação idêntica na produção em IMTA com outras espécies. Na integração do salmão (*S. salar*)

com o mexilhão (*Mytilus edulis*) foi possível observar, que um pequeno aporte de alimento exógeno para os mexilhões, conduziria a um aumento substancial da sua biomassa e produção em si, sem que isso afetasse de forma alguma o crescimento dos peixes. Neste mesmo estudo, ficou também provado que as fezes dos salmões apenas correspondiam a 20% do alimento total ingerido pelos mexilhões. Os mesmos autores confirmam, num outro estudo (2013a), que as fezes produzidas pelo salmão teriam de representar, no mínimo, 10 a 20% da dieta dos mexilhões, para que fosse realmente possível uma redução significativa da matéria orgânica em suspensão do sistema. Tal informação não foi quantificada no nosso trabalho. Contudo, e uma vez que os resultados apontam para uma melhoria, bastante significativa, da performance de crescimento dos ouriços com o aumento da taxa de alimentação, podemos deduzir, que apesar de termos sempre crescimento, por si só, os restos de alimento e as fezes provenientes dos peixes, não seriam potenciadores do rendimento máximo possível para esta espécie.

Schlosser, et al. (2005) testou a performance geral dos ouriços (*P. lividus*) consoante diferentes regimes alimentares, que consistiram numa dieta preparada à base de algas, ou apenas algas frescas. Neste caso verificaram uma melhor performance geral na alimentação com a dieta preparada, com inclusão de 20 a 40% de proteína, sendo que a sua digestibilidade foi superior a 60%. Os resultados deste trabalho vêm apoiar o nosso segundo ensaio, em que optámos por um regime alimentar composto por uma dieta preparada à base de algas, e conseguimos obter melhores resultados quando comparados com o Ensaio I, com uma digestibilidade praticamente total (86% MS e 97% proteína). Já McCarron, et al. (2009) estudou a performance de crescimento e desenvolvimento das gónadas de 3 grupos de ouriços, sob regimes alimentares diferentes (contínuo e intermitente). Após análise dos resultados, sugere que o regime de alimentação contínuo suporta melhor o desenvolvimento das gónadas dos ouriços para esta espécie, independentemente da classe de tamanho da produção.

Fabbrocini, et al. (2012) testou a performance dos ouriços (*P. lividus*) alimentados com 3 dietas à base de algas diferentes. Para a preparação das referidas dietas, à semelhança com a dieta por nós preparada, e utilizada nos ensaios de crescimento e digestibilidade dos ouriços, usaram a incorporação de agar-agar como “food binder” e como responsável pela boa durabilidade que o alimento manteve na água. Os resultados deste estudo mostraram, não só que a presença de agar não prejudica o crescimento dos animais, mas também que das 3 algas incorporadas, a dieta à base de *Ulva* foi a que obteve melhores resultados no crescimento dos ouriços. Também Cyrus et al. (2015) acaba por concluir que a incorporação de *Ulva*, numa dieta

preparada funciona como apetente, o que, juntamente com o estudo anterior, poderá justificar a elevada taxa de ingestão, crescimento e CDA observados no nosso trabalho.

Depois de todos os ensaios realizados, e simultaneamente com os resultados obtidos, conseguimos demonstrar que é possível a produção desta espécie de ouriço em IMTA, associado com robalo e algas, mantendo o sistema em equilíbrio. Para além disso, com um pequeno aporte de alimento externo, que pode ser produzido a partir de algas cultivadas no próprio sistema IMTA, conseguimos otimizar a sua produção, obtendo uma duplicação das suas taxas de crescimento.

4.3 As Algas

As macroalgas podem ser cultivadas sem adição de fertilizantes ou agroquímicos, especialmente se integradas em IMTA, uma vez que os resíduos provenientes das restantes espécies, providenciam os nutrientes, como azoto (N) e fósforo (P), essenciais e necessários ao seu desenvolvimento e crescimento (Al-Hafedh, et al., 2015; Chopin, 2014; Kang, et al., 2008). A sua habilidade de rapidamente absorver nutrientes em prol da sua performance, e a sua capacidade de os acumular nos seus tecidos, seja sob a forma de aminoácidos, hidratos, lípidos, pigmentos, etc.; faz das macroalgas ideais candidatas para integração, e/ou tratamento de efluentes em aquaculturas, acrescentando ainda a mais valia da real possibilidade de aumentar, não só o seu valor nutricional, como o seu potencial comercial (Al-Hafedh, et al., 2015; Chopin, et al., 2001; Neori, et al., 2004; Metaxa, et al., 2006). Para além disso, como organismos fotossintéticos que são, as algas são o único componente de uma aquacultura que produz oxigénio e absorve dióxido de carbono, enquanto realiza a fotossíntese, função vital para a sua sobrevivência (Neori, et al., 1996; Chopin, 2014).

O uso das macroalgas como eficientes biofiltros, tanto para remoção de nutrientes inorgânicos prejudiciais em produção integrada, como na restauração da qualidade das águas dos efluentes de aquaculturas, reduzindo significativamente o impacto da elevada carga de azoto e fósforo nestes contida, tem vindo a ser demonstrado como exequível e um excelente exemplo de ecotecnologia (Al-Hafedh, et al., 2015; Neori, et al., 2004).

O género *Ulva* é um dos preferencialmente eleitos para estudar os potenciais nesta área, devido à sua elevada produção em biomassa e então possível eficiência de biofiltração (Kang, et al., 2008). Contudo, esta capacidade depende das condições de fluxo e concentração de nutrientes, tornando-se imperativa a otimização das mesmas (Troel, et al., 2003).

São muitos os estudos que, ao longos dos anos, têm vindo a demonstrar o potencial de utilização da *Ulva lactuca*, tanto na integração como biofiltros, como no tratamento de efluentes. Neori, et al. tem vindo a estudar a capacidade que esta alga tem em remover, especialmente, a amónia. A amónia é um nutriente extremamente importante para o crescimento desta alga, mas ao mesmo tempo, é, em grande parte responsável pela carga adversa dos efluentes das aquaculturas, sendo altamente tóxico, mesmo que em pequenas concentrações, para a maioria dos vertebrados

marinhos (Kang, et al., 2008). Neori, et al. (1996) usou uma versão muito inicial do que hoje é considerado IMTA, para testar a capacidade de remoção da *U. lactuca* nas águas provenientes do cultivo de dourada (*Sparus aurata*). As algas removeram a maioria da amónia excretada pelos peixes ao mesmo tempo que oxigenaram as águas. Num outro estudo, Neori, et al. (1998) comparou a performance de crescimento e a capacidade de filtração da *Ulva* e *Gracilaria*, quando integradas com a produção de abalones (*Haliotis* sp.). Para além desta valência, a própria biomassa produzida serviu de alimento aos abalones. Neste estudo, a *Ulva* provou ser a candidata com maior aptidão para ser integrada como um bom biofiltro, apresentando não só uma capacidade de filtração significativamente maior (58%/dia), mas também uma melhor performance de crescimento. Mais recentemente, Neori, et al. (2000) testou o potencial de um sistema em IMTA com dourada, abalone, *Ulva* e *Gracilaria*. À semelhança não só com estudo anterior, mas também com o que aconteceu no nosso Ensaio I em IMTA, aqui a produção de algas em biomassa serve de alimento para os abalones. Os nutrientes excretados pelas douradas e abalones constituíram o alimento para algas, e no caso da *Ulva*, esta foi a alga que removeu mais eficientemente (80%) por filtração a TAN (*Total Ammonia Nitrogen*). A principal demonstração deste estudo foi que a *Ulva*, integrada a 1,5 kg/m³, removeu em média 67% da carga azotada de um sistema IMTA.

No que diz respeito ao presente trabalho, tanto no Ensaio I como no Ensaio II, obtivemos um bom crescimento para a *U. lactuca*, sem que em nenhum dos ensaios a sua taxa de crescimento relativa (TCR) tenha sido significativamente afetada pelas variantes testadas. Quando comparamos as TCR entre ensaios, podemos verificar, que no segundo ensaio há um aumento significativo nas taxas de crescimento, não só devido à diferente abordagem na quantificação do crescimento da alga, que reduziu significativamente o efeito de sombreamento, mas também ao aumento da carga nutricional disponível na água, resultante da alimentação administrada aos ouriços. Apesar de não termos quantificado concretamente a capacidade de remoção efetiva desta alga, em nenhum dos ensaios descritos neste trabalho, os bons resultados, tanto a nível de crescimento das algas em si, como a nível de equilíbrio dos próprios sistemas, indicam que estas são uma excelente escolha para integrar um sistema IMTA, preenchendo o importante papel de biofiltros eficazes na remoção da matéria inorgânica dissolvida. Ao mesmo tempo, por comparação com o estudo de Neori, et al. (2000), em que à exceção de diferentes espécies, é bastante semelhante com o nosso Ensaio I, nomeadamente no que toca às densidades de *stock* para a *Ulva*, podemos inferir que, por extrapolação para o nosso ensaio, a capacidade de remoção da carga inorgânica poderá ter rondado os 70%.

A par com o primeiro ensaio realizado em IMTA, decorreu o denominado ensaio III, em que pretendíamos testar a diferença no crescimento da *U. lactuca*, consoante a origem da água em que esta foi colocada a crescer. Com este ensaio conseguimos mostrar a diferença significativa no crescimento desta espécie em águas provenientes dos sistemas IMTA, quando comparada com a água retirada do mar. As TCR foram significativamente maiores nas águas provenientes do IMTA, uma vez que estas proporcionam uma maior quantidade de alimento direto, que terá sido favorável ao seu mais rápido crescimento, acompanhado por um aumento do seu valor nutricional. Os resultados do estudo levado a cabo por Shpigel, et al. (1999), demonstram precisamente o mesmo. Neste estudo analisou-se o valor nutricional dos tecidos da *U. lactuca*, através da performance do abalone (*Haliotis tuberculata* e *H. discus hannaï*), quando alimentado com algas que cresceram ou não em água enriquecidas com amónia e azoto (N). Os resultados mostraram claramente que houve diferenças entre tratamentos, na performance dos abalones, sendo que estes cresceram significativamente mais rápido e mostram muito melhores taxas de conversão do alimento (TCA), quando alimentados com algas enriquecidas. O valor nutricional acrescido da *U. lactuca* provocou uma enorme diferença nos resultados, sendo que o seu elevado teor proteico foi conseguido através de uma simples suplementação com N ($10\text{g/m}^2/\text{dia}$), nas águas de crescimento das culturas.

Com a integração das algas em sistemas IMTA, não será necessária a suplementação adicional das águas em azoto para obter os mesmos ou melhores resultados, pois a integração de diferentes níveis tróficos no mesmo sistema enriquece naturalmente as águas em N e P. Este aumento da carga de nutrientes assegurará um melhor crescimento das algas, bem como um maior potencial nutricional dos seus tecidos, podendo mesmo servir de alimento para os invertebrados integrados no sistema, ou não; sendo que esta nova valência acumulada, acresce ao potencial económico dos sistemas IMTA.

Hoje, já são muito os estudos que provam a eficiência das algas na remoção de nutrientes das águas ao mesmo tempo que melhoram o seu valor nutricional. Martínez-Aragón, et al. (2002) e Hernández, et al. (2002) testaram a capacidade de biofiltragem de 3 espécies de macroalgas (*U. rotundata*, *Enteromorpha intestinalis* e *G. gracilis*) em efluentes de robalos. Cada um destes autores mostrou, respetivamente, a capacidade do P e N de serem eficientemente removidos, com taxas muito elevadas. Os fosfatos foram quase todos removidos das águas, sendo que a *Ulva* foi a alga que obteve a taxa de remoção média mais alta (99,6%), enquanto que a *Gracilaria* demonstrou a taxa de remoção média mais baixa (62,2%). Quanto às concentrações de amónia, todas as

algas removeram eficientemente este nutriente dissolvido, com uma taxa mínima de 60%, sendo que das 3, a *Ulva* apresentou valores mais altos, que rondaram os 97%. Também Neori, et al. (2003) relata taxas de remoção da TAN muito eficientes (85-90%), ao mesmo tempo que produzia *Ulva* de elevado valor nutricional, com um teor proteico que rondou os 44%. Já Delliver, et al. (2004) e Metaxa, et al. (2006), testaram o tratamento dos efluentes da produção de robalo com HRAP (*High Rate Algal Ponds*), e compararam os resultados com o normal RAS (*Recirculating Aquaculture System*). No primeiro as macroalgas funcionaram como excelentes biofiltros, ainda baixando a mortalidade verificada no cultivo dos peixes. No segundo trabalho, para além da idêntica redução significativa da concentração de N e P dissolvidos na água, o tratamento com as algas reduziu ainda a acumulação de metais no músculo e fígado dos robalos cultivados em RAS. Neste estudo, Metaxa, et al., descreve que a densidade de *stock* dos robalos foi de 10 kg/m³, que estes são alimentados duas vezes ao dia com uma dieta com 44 a 52% proteína e 22% lípidos, e que a performance de crescimento dos peixes não foi de todo afetada pelas algas, um pouco à semelhança do que aconteceu no nosso trabalho.

Identicamente ao que acontece em terra, também é possível observar estes efeitos em *offshore*. Abreu, et al. (2009), por exemplo, testou produtividade da *G. chilensis* em mar aberto, perto de uma cultura de salmões, avaliando a sua capacidade de remoção do azoto e performance fotossintética. O crescimento em geral foi melhor quando a distância à cultura era menor; e quanto mais perto, não só melhorou a taxa de remoção de N, como aumentou o seu conteúdo nos tecidos das algas. Até a um 1 Km de distância, esta alga demonstrou manter uma boa performance de remoção nutricional.

Mais recentemente, Al-Hafedh, et al. (2015) estudou a potencialidade da integração da *U. lactuca*, para tratamento de efluentes de tilápia (*Oreochromis spilurus*), a duas densidades (3 e 6 kg/m³) e a dois caudais diferentes. A alga demonstrou elevadas taxas de crescimento específico (6%dia⁻¹), sendo que obteve uma performance ligeiramente melhor na densidade mais baixa. Contudo, a taxa de remoção de compostos azotados e fosfatados não foi afetada significativamente pelas densidades, ao contrário do que aconteceu com os caudais. O aumento do fluxo do efluente permitiu duplicar a biomassa com TCE até 12% dia⁻¹. Este estudo vem demonstrar que os caudais dos efluentes têm um maior impacto na performance de biorremediação das algas, tornando-se um parâmetro essencial a ter e conta, até mais do que propriamente as densidades a que são mantidas.

No segundo ensaio realizado em IMTA (Ensaio II), para além da *U. lactuca*, integramos o *Chondrus crispus*. Ao contrário do que aconteceu com a outra espécie, o *C. crispus* demonstrou uma TCR muito inferior, e que ao mesmo tempo foi negativamente afetada pelo aumento gradual da taxa de alimentação dos ouriços integrados nos sistemas. Azevedo, et al. (2016) testou o efeito da performance de crescimento e biofiltro da alga *Saccharina latissima*, com dois métodos de cultura: livre na coluna de água ou fixa a uma corda no fundo do tanque. De longe que obteve melhores resultados nas condições em que a alga cresceu livremente na coluna de água. Talvez, e à semelhança com o descrito neste último estudo, os resultados fossem mais satisfatórios com o *C. crispus*, se a alga tivesse sido cultivada de forma livre na coluna de água e juntamente com a *U. lactuca*.

É verdade que a *Ulva* pode não atingir o mesmo valor económico de muitas das outras macroalgas, especialmente no que diz respeito por exemplo, à extração de componentes para diversas indústrias. Contudo, esta é uma alga que apresenta uma excelente capacidade para ocupar o papel de biofiltro, especialmente em culturas integradas, podendo ainda ser utilizada como alimento de excecional valor nutricional, para animais herbívoros e omnívoros cultivados nos mesmos sistemas, como o caso dos abalones e dos ouriços-do-mar. Com este trabalho demonstramos ser possível a integração e com bons resultados.

5. Considerações Finais

Atualmente, o rápido crescimento a que se tem assistido das atividades humanas nas áreas costeiras, impõe uma pressão ainda maior sobre os já empobrecidos ecossistemas marinhos costeiros. Portanto, a legislação, diretrizes e padrões de controlo sobre a descarga ou efluentes das várias fontes, incluindo das atividades ligadas direta ou indiretamente à aquacultura, estão a tornar-se cada vez mais rigorosos em muitos países (Troell, et al., 2003).

Com o crescente desenvolvimento da aquacultura, crescem também as preocupações com os impactos ambientais causados pelos seus efluentes. As suas águas, especialmente quando geradas pela produção intensiva de peixe, contêm diferentes constituintes, incluindo matéria orgânica dissolvida, particulada, sólidos em suspensão totais, e nutrientes como o azoto e fósforo inorgânico. A maioria destes desperdícios estão diretamente ligados à alimentação e eficiência de utilização e retenção do alimento, resultando essencialmente do alimento não ingerido, fezes, e excreção urinária e branquial. Todos estes desperdícios são responsáveis pela indução de problemas como a eutrofização das águas, perda de biodiversidade e doenças nas zonas mais costeiras, onde estes efluentes são tipicamente descarregados (Al-Hafedh, et al., 2015; Piedrahita, 2003).

Nas últimas décadas, esta indústria tem vindo a reduzir substancialmente a emissão de desperdícios através da intensa pesquisa na área de nutrição, para o desenvolvimento de alimentos com melhor, e maior eficiência de conversão, proporcionando simultaneamente, uma gestão melhorada dos recursos (Troell, et al., 2003). Esta tem sido a única medida eficaz ou abordagem efetiva, por exemplo, para reduzir os impactos das descargas de nutrientes dissolvidos, dos sistemas abertos no mar, em *on* ou *offshore*. Mesmo em terra, independentemente do grau de recirculação nos sistemas que funcionam em circuito fechado (RAS), é sempre necessária a substituição de uma percentagem de água, e são sempre produzidos efluentes (Metaxa, et al., 2006).

O desenvolvimento do IMTA, ou seja, da biorremediação através do conceito da integração de espécies de diferentes níveis tróficos, que tem capacidade de restaurar a qualidade das águas descartadas ao seu estado natural, ou mais próximo do mesmo, poderá ajudar esta indústria a evitar complicações e/ou incumprimentos ao mesmo tempo, proporciona um ganho de benefícios diretos e indiretos; não só pelo melhoramento da qualidade da água, mas também pela saúde dos ecossistemas

costeiros, pela diversificação das espécies em produção, pelo aumento do lucro e rentabilidade dos sistemas em si, pela redução de riscos, e ao que parece, está também a reduzir a opinião negativa do público em geral em relação à indústria (Chopin, et al., 2001; Ridler, et al., 2007; Troel, et al., 2003)

Este trabalho permitiu demonstrar isso mesmo, que seria possível a implementação de um sistema de produção integrada, atingindo um equilíbrio favorável e rentável para todas as espécies integradas e para o próprio sistema em si. Todo este trabalho permite-nos concluir que, para este formato de IMTA, o melhor cenário de produção seria: os robalos (*Dicentrarchus labrax*) integrados a uma densidade de 7 kg/m³ e alimentados até à saciedade; os ouriços (*Paracentrotus lividus*) integrados a uma densidade de 10 kg/m³ com uma taxa de alimentação de 45g/semana; e a *Ulva lactuca* provou ser a melhor candidata para integrar este sistema com as restantes espécies.

Num futuro próximo, os passos seguintes para levar a cabo esta investigação passariam por: quantificar as diferenças entre o IMTA e monocultura das referidas espécies; testar a integração de outras algas no sistema, como a *Undaria pinnatifida*; testar o efeito de outras variantes; incorporar por exemplo a *Salicornia* como planta aquática; e testar estas condições e resultados num sistema IMTA à escala piloto, desenvolvido em condições mais próximas daquelas usadas para a produção a nível comercial, validando assim o futuro próspero destes sistemas.

Em suma, esta coprodução mostrou ser viável, provando que as águas provenientes da produção do Robalo são adequadas para produção de Ouriço-do-Mar e Alface-do-Mar. A integração destas espécies é exequível, abrindo novas oportunidades para a sua exploração de forma sustentável, e sugerindo, que à escala comercial, a produção e a diversificação económica da indústria da aquacultura sustentada é alcançável.

Referências Bibliográficas

- Abreu, M. H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A. H., & Sousa-Pinto, I. (2011). IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture*, 312, 77-87.
- Abreu, M. H., Varela, D. A., Henríquez, L., Villarroel, A., Yarish, C., Sousa-Pinto, I., & Buschmann, A. H. (2009). Traditional vs Integrated Multi-Trophic Aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. *Aquaculture*, 293, 211-220.
- Alexander, K., Potts, T., Freeman, S., Israel, D., Johansen, J., Kletou, D., Meland, M., Pecorino, D., Rebours, C., Shoten, M., Angel, D. (2015). The implications of aquaculture policy and regulation for the development of integrated multi-trophic aquaculture in Europe. *Aquaculture* 443, 16-23.
- Algaebase. (2017). Obtido de <http://www.algaebase.org/>
- Al-Hafedh, Y. S., Alam, A., & Buschmann, A. H. (2015). Bioremediation potential, growth and biomass yield of the green seaweed, *Ulva lactuca* in an integrated marine aquaculture system at the Red Sea coast of Saudi Arabia at different stocking densities and effluent flow rates. *Reviews in Aquaculture* 6, 1-11. doi:10.1111/raq.12060
- AOAC. (1980). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington.
- Azevedo, I., Marinho, G., Silva, D., & Sousa-Pinto, I. (2016). Pilot scale land-based cultivation of *Saccharina latissima* Linnaeus at sothern European climate condition: Growth and nutrient uptake in high temperatures. *Aquaculture*, 459, 166-172.
- Barrington, K., Chopin, T., & Robinson, S. (2009). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. In D. Soto (ed.). *Integrated mariculture: a global review*. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, Nº 529, 7-46.
- Barrington, K., Ridler, N., Chopin, T., Robinson, S., & Robinson, B. (2010). Social aspects of the sustainability of integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture International*, 18, 201-211. doi:10.1007/s10499-008-9236-0
- Biorede. (2017). Obtido de <http://www.biorede.pt/pesquisa.htm>

- Bolton, J., Robertson-Andersson, D., Shuuluka, D., & Kandjengo, L. (2009). Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. *Journal of Applied Phycology*, 21, 275–583. doi:10.1007/s10811-008-9385-6
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I., Corner, R. (2010). Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 365, 2897–2912. doi:10.1098/rstb.2010.0170
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2007). Ecology of *Paracentrotus lividus*. Em J. M. Lawrence, *Edible Sea Urchin: Biology and Ecology* (pp. 243-285). Amsterdam.
- Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H. B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M. B., Markager, S., Olesen, B., Arias, C., Jensen, P. D. (2011). Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresource Technology*, 102, 2595–2604.
- Buschmann, A., Troell, M., Kautsky, N., & Kautsky, L. (1996). Integrated tank cultivation of salmonids and *Gracilaria chilensis* (Garcilariales Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 326/327, 75-82.
- Castelar, B., Pontes, M. D., Costa, W. M., Moura, L. C., Dias, G. E., Lundaci, F. S., & Reis, R. P. (2015). Biofiltering efficiency and productive performance of macroalgae with potencial for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Boletim do Instituto da Pesca*, 41, 763-770.
- Chávez-Crooker, P., & Obreque-Contreras, J. (2010). Bioremediation of aquaculture wastes. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 313–317. doi:10.1016/j.copbio.2010.04.001
- Chistiakov, D., Hellemans, B., & Volckaert, F. (2007). Review of immunology of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Veterinarian Immunology and Immunopathology*, 117, 1-16.
- Cho, C., Slinger, S., & Bayley, H. (1982). Bioenergetics of salmonid fishes, energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73B, 23-42.
- Chopin, T. (2006). Integrated Multi-Trophic Aquaculture. What it is and why you should care... and don't confuse it with polyculture. *Northern Aquaculture*, 12, 4.

- Chopin, T. (2014). Seaweeds: Top Mariculture Crop, Ecosystem Service Provider. *Global Aquaculture Advocate*, 17(5), 54-56.
- Chopin, T., & Robinson, S. (January/February de 2006). Rationale for Developing Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA): an example from Canada. *Fish Farmer Magazine*, 20-21.
- Chopin, T., Buschmann, A. H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Neefus, C. (2001). Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Journal of Phycology*, 37(6), 975-986. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x
- Chopin, T., Cooper, J., Reid, G., Cross, S., & Moore, S. (2012). Open-water integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 4, 209–220. doi:10.1111/j.1753-5131.2012.01074.x
- Chopin, T., Troell, M., Reid, G. K., Knowler, D., Robinson, S. M., Neori, A., . . . Pang, S. (November/December de 2010). Integrated Multi-trophic Aquaculture. Part III: Increasing IMTA Adoption. *Global Aquaculture Advocate*, 17-20.
- Christiansen, J. S., & Siikavuopio, S. (2007). The relationship between feed intake and gonad growth of single and stocked green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in a raceway culture. *Aquaculture*, 262, 163–167. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.09.043
- Cook, E. J., & Kelly, M. S. (2007 a). Effect of variation in the protein value of the red macroalga *Palmaria palmata* on the feeding, growth and gonad composition of the sea urchins *Psammechinus miliaris* and *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Aquaculture*, 270, 207–217.
- Cook, E., & Kelly, M. (2007 b). Enhanced production of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in integrated open-water cultivation with Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture*, 237, 573–585.
- Cunha, M. E., Quental-Ferreira, H., Ribeiro, L., Moreira, M., Soares, F., Caetano, M., & Pousão Ferreira, P. (2016). *Aquacultura multi-trófica integrada em tanques de terra*. Relat. Cient. Téc. do IPMA (<http://ipma.pt>) nº 13, 23p.
- Cyrus, M. D., Bolton, J. J., Scholtz, R., Macey, B. M. (2015). The advantages of *Ulva* (Chlorophyta) as an additive in sea urchin formulated feeds: effects on palatability, consumption and digestibility. *Aquaculture Nutrition*, 21, 578-591.

- Daggett, T., Pearce, C., Tingley, M., Robinson, S., & Chopin, T. (2005). Effect of prepared and macroalgal diets and seed stock source on somatic growth of juvenile green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 244, 263-281.
- Deviller, G., Aliaume, C., Nava, M., Casellas, C., & Blancheton, J. (2004). High-rate algal pond treatment for water reuse in an integrated marine fish recirculating system: effect on water quality and sea bass growth. *Aquaculture*, 235, 331–344.
- DGRM. (2015). *Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos. Recursos da Pesca*. Lisboa, Junho 2016.
- Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M., Massari, A., Mandich, A., & Marino, G. (2008). Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture*, 275, 319-328.
- Domingues, B., Abreu, M. H., & Sousa-Pinto, I. (2014). On the bioremediation efficiency of *Mastocarpus stellatus* (Stackhouse) Guiry, in an integrated multi-trophic aquaculture system. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-014-0414-3
- d'Orbcastel, E. R., Lemarié, G., Breuil, G., Petochi, T., Marino, G., Triplet, S., . . . Blancheton, J.-P. (2010). Effects of rearing density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) biological performance, blood parameters and disease resistance in flow through system. *Aquatic Living Resources*, 23, 109-117.
- Edwards, P. (2015). Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture*, 447, 2-14.
- European Commission. (2016). *Facts and Figures on the Common Fisheries Policy*. Fisheries. 56pp.
- Fabbrocini, A., Volpe, M., Di Stasio, M., D'Adamo, R., Maurizio, D., Coccia, E., & Paolucci, M. (2012). Agar-based pellets as feed for sea urchins (*Paracentrotus lividus*): rheological behaviour, digestive enzymes and gonad growth. *Aquaculture Research*, 43, 321-331. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02831.x
- FAO. (2006). State of World Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAO Fisheries Technical Paper*, Nº 500.
- FAO. (2014). *World Aquaculture Status*. Rome: FAO.
- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture. *Contributing to food security and nutrition for all*, 200pp.

FAO. (2017). Obtido de <http://www.fao.org>

Fernandez, C., & Boudouresque, C. (1998). Evaluating artificial diets for small *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Echinoderms: San Francisco, Moi & Telford (eds)*, 651-657. doi:Balkema, Rotterdam, ISBN 90 5410 929 7

Fernandez, C., & Boudouresque, C. (2000). Nutrition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different artificial food. *Marine Ecology Progress Series*, 204, 131-141. Obtido de <http://www.jstor.org/stable/24863629>

Fernández, Y. G. (2014). *Efecto de la irradiación y el flujo de nutrientes sobre el contenido en polisacáridos ácidos en macroalgas cultivadas*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España.

Ferreira, J., Saurel, C., & Ferreira, J. (2012). Cultivation of gilthead bream in monoculture and integrated multi-trophic aquaculture. Analysis of production and environmental effects by means of the FARM model. *Aquaculture* 358-359, 23-34.

Fishbase. (2017). Obtido de <http://www.fishbase.org/>

Fiske, C., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 66, 375-400.

Focardi, S., Corsi, I., & Franchi, E. (2005). Safety issues and sustainable development of European aquaculture: new tools for environmentally sound aquaculture. *Aquaculture International*, 13, 3–17.

Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Furukawa, A., & Tsukahara, H. (1966). On the acid digestion of chomic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 32, 502-506.

Grosjean, P., Spirlet, C., Gosselin, P., Vaitilingon, D., & Jangoux, M. (1998). Land-based, closed-cicle Echiniculture of *Paracentrotus lividus* (Lamark) (Echinoidea: Echinodermata): A long-term experiment at a pilot scale. *Journal of Shellfish Research*, 17, 1523-1531.

- Grote, B. (2016). Bioremediation of aquaculture wastewater: Evaluating the prospects of the red alga *Palmaria palmata* (Rhodophyta) for nitrogen uptake. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-016-0848-x
- Hammer, H., Hammer, B., Watts, S., Lawrence, A., & Lawrence, J. (2006). The effect of dietary protein and carbohydrate concentration on the biochemical composition and gametogenic condition of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 334, 109-121.
- Handâ, A., Min, H., Wang, X., Broch, O. J., & Reitan, K. I. (2012). Incorporation of fish feed and growth of blue mussels (*Mytilus edulis*) in close proximity to salmon (*Salmo salar*) aquaculture: Implications of integrated multi-trophic aquaculture in Norwegian coastal waters. *Aquaculture* 356-357, 328-341.
- Heflin, L., Gibbs, V., Jones, W., Makowsky, R., Lawrence, A., & Watts, S. (2013). Growth rates are related to production efficiencies in juveniles of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(6), 1673-1683.
- Hernández, I., Martínez-Aragón, J., Tovar, A., Pérez-Lloréns, J., & Vergara, J. (2002). Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 2. Ammonium. *Journal of Applied Phycology*, 14, 375–384.
- Ihsan, Y. N. (2012). *Nutrient Fluxes in Multitrophic Aquaculture Systems*. Kiel, Indonesia.
- Israel, D., Lupatsch, I., Goldan, O., & Angel, D. L. (2014). Digestibility of waste effluents from sea bream culture by the omnivorous grey mullet (*Mugil cephalus*).
- Jeffries, E. (2017). *Seafood and the Mediterranean: Local Tastes, Global Markets*. EU Mediteranean: WWF.
- Kang, Y. H., Shin, J. A., Kim, M. S., & Chung, I. K. (2008). A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) during the summer. *Journal of Applied Psychology*, 20, 183–190.
- Kaushik, S. (1980). Influence of nutritional status on the daily patterns of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reproduction Nutrition Development*, 20, 1751-1765.
- Kimura, H., & Notoya, M. (s.d.). *Ulva pertusa* and *Undaria undarioides* culture for reducing nitrogen from fish culture area in Wakayama Prefecture, Japan.

- Klinger, D., & Naylor, R. (2012). Searching for Solutions in Aquaculture: Charting and Sustainable Course. *Annual Review of Environment and Resources*, 37, 247–276. doi:10.1146/annurev-environ-021111-161531
- Koroleff, F. (1983). Determination of ammonia. In: Grasshoff R., Ehrhardt M. & Kromling R. (eds) Methods of seawater analysis. *Verlag Chimic, 2nd edn*, 150-157.
- Krause, G., Brugere, C., Diedrich, A., Ebeling, M. W., Ferse, S. C., Mikkelsen, E., . . . Troell, M. (2015). A revolution without people? Closing the people–policy gap in aquaculture development. *Aquaculture*, 447, 44-55.
- Lupatsch, I., Santos, G., Schrama, J., & Verreth, J. (2010). Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 298, 245 -250.
- MACOI. (2017). *Macroalgae*. Obtido de Portuguese Seaweed Website: <http://macoi.ci.uc.pt/>
- Marinho, G., Nunes, C., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Rema, P., & Valente, L. M. (2013). The IMTA - cultivated Chlorophyta *Ulva spp.* as a sustainable ingredient in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1359-1367.
- Martínez-Aragón, J., Hernández, I., Pérez-Lloréns, J., Vázquez, R., & Vergara, J. (2002). Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 1. Phosphate. *Journal of Applied Phycology*, 14, 365–374.
- Martínez-Espiñeira, R., Chopin, T., Robinson, T., Noce, A., Knowler, D., & Yip, W. (2015). Estimating the biomitigation benefits of Integrated Multi-Trophic Aquaculture: A contingent behavior analysis. *Aquaculture*, 437, 182–194.
- Matos, J., Costa, S., Rodrigues, A., Pereira, R., & Sousa-Pinto, I. (2006). Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. *Aquaculture*, 252, 31-42.
- McBride, S. C., Price, R. J., Tom, P. D., Lawrence, J. M., & Lawrence, A. L. (2004). Comparison of gonad quality factors: color, hardness, and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. *Aquaculture*, 233, 405–422.

- McCarron, E., Burnell, G., & Mouzakitis, G. (2009). Growth assessment on three size classes of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* using continuous and intermittent feeding regimes. *Aquaculture*, 288, 83–91.
- Metaxa, E., Deviller, G., Pagand, P., Alliaume, C., Casellas, C., & Blancheton, J. (2006). High rate algal pond treatment for water reuse in a marine fish recirculation system: Water purification and fish health. *Aquaculture*, 252, 92–101.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A. H., Kraemer, G. P., Halling, C., Yarish, C. (2004). Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231(1-4), 361-391. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.11.015
- Neori, A., Krom, M., Ellner, S., Boyd, C., Popper, D., Rabinovitch, R., Rabinovitch, P. J., Dvir, O., Zuber, D., Ucko, M., Angel, D., Gordin, H. (1996). Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish-seaweed culture units. *Aquaculture*, 141, 183- 199.
- Neori, A., Msuya, F., Shauli, L., Schuenhoff, A., Kopel, F., & Shpigel, M. (2003). A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 15, 543-553.
- Neori, A., Ragg, N., & Shpigel, M. (1998). The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within an abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. *Aquacultural Engineering*, 17, 215–239.
- Neori, A., Shpigel, M., & Ben-Ezar, D. (2000). A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture*, 186, 279-291.
- Neori, A., Troell, M., Chopin, T., Yarish, C., Critchley, A., & Buschmann, A. (2007). The Need for a Balanced Ecosystem Approach to Blue Revolution. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 49(3), 36-43. Obtido de <http://doi.org/10.3200/ENVT.49.3.36-43>
- Nobre, A. M., Robertson-Andersson, D., Neori, A., & Sankar, K. (2010). Ecological–economic assessment of aquaculture options: Comparison between abalone monoculture and integrated multi-trophic aquaculture of abalone and seaweeds. *Aquaculture*, 360, 106-126.
- Pais, A., Chessa, L., Serra, S., Rui, A., Meloni, G., & Donno, Y. (2007). The impact of commercial and recreational harvesting for *Paracentrotus lividus* on shallow

- rocky reef sea urchin communities in North-western Sardinia, Italy. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73, 589e597. doi:10.1016/j.ecss.2007.02.011
- Papoutsoglou, S., Tziha, G., Vrettos, X., & Athanasiou, A. (1998). Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquacultural Engineering*, 18, 135-144.
- Peres, H., Santos, S., & Oliva-Teles, A. (2014). Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(5), 1339-1347.
- Piedrahita, R. (2003). Reducing the potencial environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226, 35-44.
- Read, P., & Fernandes, T. (2003). Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture*, 226, 139–163. doi:10.1016/S0044-8486(03)00474-5
- Reid, G. K., Chopin, T., Robinson, S. M., Azevedo, P., Quinton, M., & Belyea, E. (2013a). Weight ratios of kelps, *Alaria esculenta* and *Saccharina latissima*, required to sequester dissolved inorganic nutrients and supply oxygen for Atlantic salmon, *Salmo salar*, in integrated multi-trophic aquaculture systems. *Aquaculture*, 408-409, 34-46.
- Reid, G., Cranford, P., Robinson, S., Filgueira, R., & Guyondet, T. (2011). Open-water integrated multi-trophic aquaculture (IMTA): modelling the shellfish component. *Bulletin of the Aquaculture Association of the Canada*, 109(2), 3-12.
- Reid, G., Robinson, S., Chopin, T., & MacDonald, B. (2013b). Dietary proportion of fishculture solid wastes required by shellfish to reduce the net organic load in open-water integrated multi-trophic aquaculture: A scoping exercise with co-coculture Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Blue mussel (*Mytilus edulis*). *J. Shellfish Res.*, 32, 509-517.
- Ren, J. S., Stenton-Dozey, J., Plew, D. R., Fang, J., & Gall, M. (2012). An ecosystem model for optimising production in integrated multitrophic aquaculture systems. *Ecological Modelling*, 246, 34-46.
- Ridler, N., Wowchuk, M., Robinson, B., K., B., Chopin, T., Robinson, S., Page, F., Reid, G., Szemerda, M., Sewuster, J., S., B.-T. (2007). Integrated Multitrophic

- Aquaculture (IMTA): A Potencial Strategic for Farmers. *Aquaculture Economics & Management*, 11:1, 99-110. doi:10.1080/13657300701202767
- Romalde, J. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5, 3-9.
- Ruyet, J.-L., & Le Bayon, N. (2009). Effects of temperature, stocking density and farming conditions on fin damage in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 22, 349-362.
- Sammouth, S., d'Orbcastel, E. R., Gasset, E., Lemarié, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J-L., Fivelstad, S., Blancheton, J.-P. (2009). The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering*, 40(2), 72-78. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.11.004
- Schlosser, S. C., Lupatsch, I., Lawrence, J. M., Lawrence, A. L., & Shpigel, M. (2005). Protein and energy digestibility and gonad development of the European sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) fed algal and prepared diets during spring and fall. *Aquaculture Research*, 36, 972-982. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01306.x
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E., & Verreth, J. (2005). Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 32, 379-401.
- Schuenhoff, A., Shpigel, M., Lupatsch, I., Ashkenazi, A., Msuya, F., & Neori, A. (2013). A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture*, 221, 167-181.
- Shpigel, M., McBride, S., Marciano, S., Ron, S., & Ben-Amotz, A. (2005). Improving gonad colour and somatic index in the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquacultura*, 245, 101– 109.
- Shpigel, M., Raggs, N., Lupatsch, I., & Neori, A. (1999). Protein content determines the nutritional value of the seaweed *Ulva lactuca* L for the abalone *Haliotis tuberculata* L. and *H. discus hannai* INO. *Journal of Shellfish Research*, 18, 227-233.
- Silva, M., Vieira, L., Almeida, A., & Kijjoa, A. (2013). The Marine Macroalgae of the Genus *Ulva*: Chemistry, Biological Activities and Potencial Applications. *Oceanography*, 1, 1-6. doi:10.4172/2332-2632.1000101

- Silva, P. (2012). Crescimento do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* em viveiro na zona costeira da Ericeira, Portugal. *Dissestação de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal.
- Siskey, M., & Baldwin, R. (2011). *Integrated Multi-Trophic Aquaculture*. Sea Grant, TECH 797; University of New Hampshire.
- Skriptsova, A., & Miroshnikova, N. (2011). Laboratory experiment to determine the potential of two macroalgae from the Russian Far-East as biofilters for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Bioresource Technology*, 102, 3149–3154.
- Soto, D. (2009). Integrated mariculture: a global review. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, Nº 529, 183p.
- Spirlet, C., Grosjean, P., & Jangoux, M. (2000). Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lílidus* (Lamarck) (Echinodermata). *Aquaculture*, 185, 85–99.
- Stabili, L., & Pagliara, P. (2015). The sea urchin *Paracentrotus lividus* immunological response to chemical pollution exposure: The case of lindane. *Chemosphere*, 134, 60-66.
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A., Kautsky, N., & Yarish, C. (2003). Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture*, 226, 69–90. doi:10.1016/S0044-8486(03)00469-1
- Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A., & Fang, J. (2009). Ecological engineering in aquaculture - Potencial for integrated multitrophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 297(1-4), 1-9. Obtido de <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.010>
- Troell, M., Naylor, R., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P., Folke, C., . . . de Zeeuw, A. (2014). Does Aquaculture Add Resilience To The Global Food System?
- Wartenberg, R., Feng, L., Wu, J., Mak, Y., Chan, L., Telfer, T., & Lam, P. (2017). The impacts of suspended mariculture on coastal zones in China and the scope for Integrated Multi-trophic Aquaculture. *Ecosystem Health and Sustainability*. doi:<http://dx.doi.org/10.1080/20964129.2017.1340268>
- WWF. (2017). *Guia WWF para o Consumo de Pescado*. Obtido de WWF: <http://guiapescado.wwf.pt/species/robalo/>

Anexos

Anexo I – Protocolo para a Determinação da Humidade

Material

Estufa

Exsicador

Cadinhos de porcelana

Balança analítica

Procedimento

- 1 - Pesar com precisão (0.1 mg) o cadinho (A). (Nota: o cadinho deve estar devidamente limpo, ter sido seco em estufa durante 30 minutos e deixado arrefecer no exsicador).
- 2 - Pesar para dentro do cadinho cerca de 1 g da amostra finamente moída. Anotar o peso do cadinho + amostra (**B**).
- 3 - Transferir o cadinho com a amostra para a estufa a 105 °C.
- 4 - Após 24 h retirar o cadinho com a amostra da estufa e colocá-lo no exsicador, deixando-o arrefecer até à temperatura ambiente (cerca de 30 minutos).
- 5 - Pesar o cadinho com a amostra seca (**C**).

Cálculo

$$\text{Humidade da amostra (\%)} = \frac{(B-A) - (C-A)}{(B-A)} \times 100$$

Anexo II – Protocolo para a Determinação das Cinzas

Material

Mufla

Exsicador

Cadinhos de porcelana

Balança analítica

Procedimento

- 1 - Pesar com precisão (0.1 mg) o cadinho devidamente limpo e seco (**A**).
- 2 - Pesar para dentro do cadinho cerca de 1 a 2 g de amostra previamente seca. Anotar o peso do cadinho + amostra (**B**).
- 3 - Transferir o cadinho com a amostra para a mufla a 450 °C.
- 4 - Após 8 - 16 h retirar o cadinho da mufla e colocar no exsicador. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente (cerca de 30 minutos).
- 5 - Pesar o cadinho com a amostra (**C**).

Cálculo

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{(C-A)}{(B-A)} \times 100$$

Anexo III – Protocolo para a Determinação da Proteína Bruta

Material

Bloco de digestão Tecator

Unidade de Destilação Tecator

Bureta graduada

Balança analítica

Tubos de digestão

Reagentes

Pastilhas Kjeldahl (catalizador)

Ácido sulfúrico concentrado

Tiosulfato de sódio

Solução saturada de ácido bórico

Ácido clorídrico 0.1 ou 0.2 N

Hidróxido de sódio 40 %

Indicador (BDH 4.5)

Procedimento (método macro)

- 1 - Pesar com precisão de 0.1 mg cerca de 0.5 a 1 g de amostra e colocá-la num tubo de digestão.
- 2 - Adicionar 1 pastilhas de Kjeldahl (Se) e 15 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- 3 - Preparar dois brancos, colocando em cada um 1 pastilhas de Kjeldahl e 15 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- 4 - Colocar os tubos no bloco de digestão previamente aquecido a 420 °C (necessita cerca de 1h para atingir esta temperatura) adaptar e ligar o sistema de exaustão.
- 5 - Digerir as amostras durante 1 h. Após este tempo retirar os tubos do bloco digestor e deixar arrefecer (forma-se um ligeiro precipitado).

6 - Colocar no sistema de destilação automático.

7 - Colocar 25 ml de ácido bórico e 10 gotas do indicador num matraz de 250 ml (a solução fica alaranjada).

8 - Proceder à destilação da amostra na unidade de destilação Tecator. Automaticamente são adicionados 60 ml de água destilada e 60 ml de NaOH a 40 %. Deixar destilar durante 3 minutos, recolhendo o destilado no matraz com ácido bórico (a solução passa a azul).

9 - Titular o destilado com ácido clorídrico 0.1 ou 0.2 N até a solução virar novamente a alaranjado. Registe o volume de titulante gasto.

Cálculo

$$N \text{ total (\%)} = \frac{(A-B)}{P} \times 0.2 \times 14.007 \times 100$$

P

$$\text{Proteína Bruta (\%)} = N \text{ total} \times 6.25$$

Em que:

A = volume de titulante gasto com a amostra (ml)

B = volume de titulante gasto com o branco (ml)

P = peso da amostra (mg)

Anexo IV – Protocolo para a Determinação da Gordura Bruta

1. Método por Soxtec

Material

Aparelho de extração Soxtec

Copos de extração

Cartuchos de extração

Estufa

Balança analítica

Exsicador

Reagente

Éter de petróleo (ponto de ebulição 40-60 °C)

Procedimento

- 1 - Pesar rigorosamente os copos de extração secos e limpos (**A**).
- 2 - Pesar cerca de 1 g de amostra (**B**), colocá-la dentro do cartucho de extração e tapar com algodão cardado.
- 3 - Fixar o adaptador circular no cartucho de extração e colocá-lo no extrator com auxílio do suporte próprio.
- 4 - Abra o fluxo de água do condensador e ligue as placas de aquecimento. A temperatura deve ser regulada a 120°C (demora cerca de 30 minutos a atingir a temperatura).
- 5 - Verter 40 - 50 ml de éter de petróleo para o copo de extração e coloque-o na unidade de extração com o auxílio do suporte próprio.
- 6 - Fixe o copo ao extrator com a alavanca. Deixar extrair na posição *Boiling* durante 20 a 40 minutos e na posição *Rinsing* durante 40 a 75 minutos, com a torneira aberta.

7 - Evapore o solvente com a torneira fechada e o manípulo na posição *Evaporation* e botão *air* ligado.

8 - Retirar o copo de extração e secar em estufa a 100°C durante 30 minutos.

9 - Depois de seco, arrefecer o copo com o extrato no exsicador e pesar (**C**).

Cálculo

$$\text{Gordura bruta (\%)} = \frac{(C-A)}{B} \times 100$$

2. Método por Folch

Material

Tubos de plástico com tampa verde

Tubos de centrifuga

Pipetas de 1 e 5 ml

Centrifuga

Vórtex

Reagentes

Clorofórmio

Metanol

Mistura clorofórmio:metanol - 2:1 em volume

Reagente de lavagem – clorofórmio:metanol:água (3:48:47)

Procedimento

1 - Pesar 200mg de amostra (no caso de fígado fresco: com um bisturi cortar em pedacinhos e com a espátula esmagar tudo até homogeneizar o preparado) para os tubos de plástico com tampa verde.

- 2 - Adicionar 4 ml de mistura clorofórmio:metanol.
- 3 - Homogeneizar no vórtex durante 3 minutos.
- 4 - Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
- 5 - Decantar o sobrenadante para um tubo de centrifuga previamente pesado.
- 6 - Adicionar 1 ml de água e homogeneizar suavemente (no vórtex).
- 7 - Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- 8 - Com uma pipeta de Pasteur remover a camada superior sem perturbar a camada inferior.
- 9 - Suavemente adicionar cerca de 0,5 ml (aproximadamente) de reagente de lavagem de modo a não perturbar a fase inferior.
- 10 - Repetir os últimos dois passos as vezes que forem necessárias.
- 11 - Adicionar 0.2 ml de metanol, homogeneizar e deixar evaporar na estufa.

Cálculo

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{(\text{peso tubo centrifuga com lípidos} - \text{peso tubo centrifuga})}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

Anexo V – Protocolo para a Determinação do Óxido de Crómio

Material

Balões de Kjeldahl de 30 ml

Mantas de aquecimento

Balões volumétricos de 25 ml, 50 ou 100 ml

Funil

Espectrofotómetro

Pipetas

Reagentes

Ácido nítrico

Ácido perclórico a 70 %

Nota de Perigo

Todas as operações que envolvam ácido nítrico ou ácido perclórico devem ser feitas numa hotte com proteção para as mãos e visão.

O ácido perclórico forma compostos instáveis explosivos em contacto com matéria orgânica. Deve, por isso, ter-se um cuidado extremo com a sua utilização. No caso de entornar sobre a pele lavar imediatamente com uma base fraca e depois com água destilada.

Procedimento

1 - Pesar, com precisão de 0.1 mg, 50 a 100 mg de amostra de fezes (100 a 200 mg de dieta) para um balão de Kjeldahl de 30 ml (a amostra deve conter entre 0.5 e 3 mg de óxido de crómio).

2 - Adicione a cada balão 5 ml de ácido nítrico concentrado, tomando o cuidado de impedir que qualquer partícula de amostra fique aderida ao gargalo do frasco.

3 - Ligue a manta de aquecimento e deixe digerir a uma temperatura não muito elevada durante 20 a 30 minutos, até toda a matéria orgânica ter sido solubilizada (cor verde pálido da solução). Rode periodicamente o balão, de modo a evitar a deposição de partículas na parede. Se o volume de ácido no frasco tiver diminuído consideravelmente devido a evaporação por sobreaquecimento, adicione mais 5 ml de ácido nítrico.

4 - Depois da amostra ter sido completamente digerida, retire os balões do aquecimento e deixe arrefecer durante 5 a 10 minutos.

5 - Adicione 3 ml de ácido perclórico a cada frasco e torne a aquecê-los durante 10 a 30 minutos, até que a cor verde passe a amarelado, laranja ou vermelho (neste ponto o Cr_3^+ é oxidado a Cr_6^+). Mantenha o aquecimento durante mais 10 minutos.

6 - Retire os balões do aquecimento, deixe arrefecer e adicione 10 ml de água destilada.

7 - Transfira, através de um funil, o conteúdo do balão para um balão volumétrico de 100 ml e perfaça o volume com água destilada.

8 - Coloque a solução numa cuvete e leia a absorvância a 350 nm usando água destilada como branco.

Cálculo

A curva padrão obtida pela técnica de oxidação com ácido é a seguinte:

$$Y = 0.2089 X + 0.0032$$

Em que:

Y = densidade ótica a 350 nm

X = teor em óxido de crómio da amostra em mg/100 ml

Conteúdo em óxido de crómio da amostra:

Conteúdo em óxido de crómio (mg): $(Y - 0.0032) / 0.2089 = X (100 \text{ ml}) (*)$

Conteúdo em óxido de crómio (% da amostra): $(X / S) \times 100$

Em que:

S = peso da amostra em mg

(*) se o balão volumétrico for de 50 ml dividir X por 2

se o balão volumétrico for de 25 ml dividir X por 4

Anexo VI – Protocolo para a Determinação dos Metabolitos Plasmáticos

Material

Placas de 96 poços

Pipetas calibradas e respetivas pontas

Gelo

Kit do Metabolito a Analisar (*)

Eppendorfs de 0,65 ml

(*) Cada Kit é acompanhado com uma **brochura protocolar** onde contém a seguinte informação individual: temperatura de armazenamento; princípio do método; significado clínico do metabolito; reagentes; composição dos reagentes incluindo precauções, preparação, armazenamento e estabilidade/durabilidade, sinais de deterioração (alteração na cor; presença de partículas, turbidez), e Absorbância do Branco.

Procedimento

1 - Colocar as amostras a descongelar em gelo.

2 - Colocar os reagentes presentes no Kit em “barquinhos”

3 - Passar as amostras já descongeladas no vórtex

4 - Para eppendorfs de 0,65 ml pipetar amostra + reagente. Seguir as quantidades indicadas na brochura do kit. Após mistura, deixar incubar no agitador, seguindo os tempos e temperaturas indicadas na brochura.

5 - Pipetar cerca de 200 µl da mistura para cada poço da microplaca. Fazer sempre dois brancos e dois standards, seguindo as quantidades indicadas na brochura.

6 - Ler absorbância (*Colorimeter Measuring*)

Cálculo

Para cada metabolito, consultar os cálculos indicados no respetivo protocolo.

Anexo VII – Protocolo para a Preparação da Dieta Experimental dos Ouriços

Material

Balança analítica

Mantas de aquecimento

Matrizes

Tabuleiro

Gobelés

Vareta de vidro

Reagentes

Pó de *Ulva* desidratada

Agar-agar

Óxido de Crómio

Água destilada

Procedimento

1 - Colocar 200 ml de água destilada num matraz, e numa manta de aquecimento deixar aquecer lentamente até levantar fervura.

2 - Com o auxílio de uma vareta de vidro, juntar lentamente 6 g de agar-agar evitando que se formem grumos e agitar firmemente até obter uma mistura homogénea.

3 - Juntar lentamente 10 g de pó de *Ulva* e mexer até este se dissolver por completo

4 - Apenas no caso de ensaios de digestibilidade - Juntar lentamente 6 g de óxido de crómio (Cr_2O_3) e agitar até o preparado estar uniforme.

5 - Com a devida precaução, uma vez que o preparado está quente, colocar uniformemente num tabuleiro cobrindo o fundo evitando a formação de bolhas de ar.

6 - Deixar arrefecer à temperatura ambiente e conservar no frigorífico a -15°C .